

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ»

ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ
ΑΝΑΒΟΛΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΣΕ ΤΡΙΧΑ ΚΟΥΝΕΛΙΟΥ
ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΕΦΑΠΑΞ ΧΟΡΗΓΗΣΗ
(*IN VIVO* –MODEL STUDY)

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ
ΓΡΙΚΟΣ ΜΟΣΧΟΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2018

UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCE
DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY
MASTER IN TOXICOLOGY

DETECTION AND QUANTIFICATION OF
ANABOLIC SUBSTANCES IN HAIR OF RABBITS
AFTER A SINGLE-DOSE ADMINISTRATION
(*IN VIVO* - MODEL STUDY).

MASTER OF SCIENCE DEGREE
GRIKOS MOSCHOS

LARISA 2018

ΕΠΙΒΛΕΠΟΝΤΕΣ ΚΑΘΗΓΗΤΕΣ

ΤΣΑΤΣΑΚΗΣ ΑΡΙΣΤΕΙΔΗΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑΣ, ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ,
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΚΡΗΤΗΣ

ΤΣΙΤΣΙΜΠΙΚΟΥ ΧΡΙΣΤΙΝΑ, ΓΕΝΙΚΟ ΧΗΜΕΙΟ ΚΡΑΤΟΥΣ , ΕΘΝΙΚΟ ΓΡΑΦΕΙΟ
ΣΤΗΡΙΞΗΣ REACH & CLP

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΤΣΑΤΣΑΚΗΣ ΑΡΙΣΤΕΙΔΗΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑΣ, ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ,
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΚΡΗΤΗΣ

ΤΖΑΤΖΑΡΑΚΗΣ ΕΜΜΑΝΟΥΗΛ, ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑΣ,
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΚΡΗΤΗΣ

ΤΣΙΤΣΙΜΠΙΚΟΥ ΧΡΙΣΤΙΝΑ, ΓΕΝΙΚΟ ΧΗΜΕΙΟ ΚΡΑΤΟΥΣ, ΕΘΝΙΚΟ ΓΡΑΦΕΙΟ
ΣΤΗΡΙΞΗΣ REACH & CLP

Στην οικογένεια μου

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής διατριβής πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Τοξικολογίας και Εγκληματολογικής Χημείας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης και αποτελεί μέρος του προγράμματος μεταπτυχιακών σπουδών «Τοξικολογία» του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Θερμές ευχαριστίες οφείλω στους επιβλέποντές μου, Καθηγητή Τοξικολογίας κ. Τσατσάκη Αριστείδη και την κ. Τσιτσιμπίκου Χριστίνα για την εμπιστοσύνη τους και την ευκαιρία που μου δώσανε να ασχοληθώ με ένα τόσο ενδιαφέρον θέμα.

Θα ήθελα επιπρόσθετα να ευχαριστήσω τον Επίκουρο Καθηγητή Τοξικολογίας, κ. Τζατζαράκη Μανώλη, διότι η συμβολή του στον σχεδιασμό της *in vivo* πειραματικής διαδικασίας, στην εκτέλεση των αναλυτικών μετρήσεων αλλά και τη συγγραφή της εργασίας ήταν καθοριστική.

Οφείλω να εκφράσω και ένα μεγάλο ευχαριστώ στο διοικητικό προσωπικό του εργαστηρίου καθώς και σε όλους τους διδακτορικούς και μεταπτυχιακούς φοιτητές για την εποικοδομητική συνεργασία τους αλλά και το ευχάριστο κλίμα που δημιουργήθηκε κατά την παραμονή μου εκεί.

Τέλος θέλω να εκφράσω βαθιές ευχαριστίες στους δικούς μου ανθρώπους για την αμέριστη υποστήριξή τους και την υπομονή τους.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το φαινόμενο της χρήσης των αναβολικών ουσιών στον επαγγελματικό αθλητισμό αλλά και σε χώρους γυμναστηρίων σε παγκόσμιο επίπεδο, τα τελευταία χρόνια λαμβάνει διαστάσεις μάλιστα. Κρίνεται, λοιπόν, αναγκαία η λήψη μέτρων από τους αρμόδιους φορείς για την αντιμετώπιση και την καταπολέμησή του.

Η μπολντενόνη είναι ένα αναβολικό ανδρογόνο στεροειδές το οποίο προκύπτει από τη χημική τροποποίηση του πρόδρομου μορίου της τεστοστερόνης και έχει δύο ισομερή την 17α-μπολντενόνη και την 17β-μπολντενόνη, λόγω της υδροξυλομάδας στη θέση C-17. Αρχικά δημιουργήθηκε για κτηνιατρική χρήση, ενώ πλέον χορηγείται παράνομα σε ζώα αλλά και τους ανθρώπους.

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η διερεύνηση και η αξιολόγηση της καταλληλότητας της τρίχας, ως βιολογικό υπόστρωμα για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό της αναβολικής ουσίας, μπολντενόνης, σε σχέση με την ανίχνευση στα συμβατικά υποστρώματα όπως ούρα και αίμα.

Για την υλοποίηση του πειράματος επιλέχθηκαν ως πειραματόζωα τα κουνέλια, τα οποία χωρίστηκαν σε δυο ομάδες (Group), η μία (ομάδα Α) της εφάπαξ και υψηλής δόσης και η δεύτερη (ομάδα Β) των χαμηλών και επαναλαμβανόμενων δόσεων. Ακολούθησε δειγματοληψία ούρων, αίματος, τριχών και ιστών, οι οποίοι μετά την κατάλληλη επεξεργασία αναλύθηκαν με σύστημα υγρής χρωματογραφίας/φασματομετρίας μάζας (LC-MS).

Από τα αποτελέσματα της ανάλυσης των διάφορων υποστρωμάτων, τα οποία λήφθηκαν από τα πειραματόζωα προκύπτει ότι, στα ούρα ανιχνεύεται η μητρική ουσία (101,9 ng/ml) αλλά κυρίως ο μεταβολίτης της (2142,7 ng/ml) και η μεγαλύτερη ποσότητα (92%) αυτής απεκκρίνεται τη 2^η μέρα μέσω των ούρων. Στο αίμα ανιχνεύεται η μητρική ουσία (28,7, 28,2 και 29,4 ng/ml), καθώς και ο μεταβολίτης της (17,6 και 20,6 ng/ml) για την ομάδα Α, για τις τρεις πρώτες μέρες μετά τη χορήγηση. Στην τρίχα, για την ομάδα Α, ανιχνεύεται μόνο η μητρική ουσία (0,069 ng/ml τμηματικό τρίχωμα και 0,026 ng/ml ολικό τρίχωμα) την 15^η ημέρα και στη συνέχεια μειώνεται φτάνοντας σε σημείο να μην ανιχνεύεται καθόλου. Στην ομάδα Β δεν ανιχνεύθηκε καμία ουσία, γεγονός το οποίο πιθανόν να οφείλεται είτε στην χαμηλή δόση χορήγησης είτε στο μικρό χρονικό διάστημα χορήγησης της ουσίας. Όσον αφορά τους ιστούς, η μητρική ουσία δεν ανιχνεύθηκε σε κανέναν από αυτούς, ενώ ανιχνεύθηκε ο μεταβολίτης σε ήπαρ, νεφρούς, αλλά όχι στην καρδιά.

Συμπερασματικά αναφέρεται ότι, ούρα και αίμα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την εκτίμηση της έκθεσης ενός οργανισμού στην μολντενόνη, όπως επίσης και το υπόστρωμα της τρίχας, όπου βιοδείκτης έκθεσης στην μολντενόνη είναι η ίδια η μητρική ουσία.

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: Μολντενόνη, αναβολικά στεροειδή, συσσώρευση, *in-vivo*, τρίχα, υγρή χρωματογραφία, φασματομετρία μαζών.

ABSTRACT

The practice of anabolic steroids being used both by professional athletes and in gyms has become a serious issue worldwide over the past few years. Therefore, it is essential for international organizations to take measures in order to tackle and eradicate this problem.

Boldenone is an anabolic steroid produced by the chemical modification of the initial testosterone molecule and has two isomers the 17a-boldenone and the 17b-boldenone because of the C-17 hydroxylation. Initially was created for veterinary medicine but recently the illegal use concern both animals and humans.

The purpose of this study is the investigation and the evaluation of the hair as a biological material for the detection and the quantity definition of boldenone in comparison with the detection of usual materials such as urine and blood.

Rabbits were used as laboratory animals and separated into two Groups. Group A received a single high dose and group b low consecutive doses. After the administration, samples of urine, blood, hair and tissue were analyzed using the LC-MS system.

The results indicate that in urine, the initial matter (101,9 ng/ml) such as its metabolite was detected (2142,7 ng/ml). The huge amount (92%) was excreted the second day. In blood the initial matter (28,7, 28,2 and 29,4 ng/ml) and its metabolite (17,6 and 20,6 ng/ml) were detected three first days after the administration for the Group A. In hair the initial matter (0,069 ng/ml segment hair and 0,026 ng/ml total hair) was only detected the 15th day and then gradually decreased till the complete ebbing for the Group A. In Group B no matter was detected. This is due to the low dose administrated or to the short time of administration. As for the tissue, the initial matter was not detected whereas its metabolites were detected in the liver, kidneys but not in the heart tissue.

In conclusion, blood and urine can be used as biological materials for the evaluation of the exposure of an individual to boldenone. The hair surface can be also used but the biological marker of exposure to boldenone is only the initial matter.

KEYWORDS: Boldenone, anabolic steroids, accumulation, *in-vivo*, hair, liquid chromatography, mass spectrometry.

Πίνακας Περιεχομένων

A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	1
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	2
1.1. Ιστορική Αναδρομή	4
1.2. Ορισμός Ντόπινγκ	5
1.3. Απαγορευμένες Ουσίες και Μέθοδοι	6
1.3.1. Απαγορευμένες Ουσίες.....	6
1.3.2. Απαγορευμένες Μέθοδοι.....	7
1.4. Αναβολικά Ανδρογόνα Στεροειδή	7
2. ΜΠΟΛΝΤΕΝΟΝΗ (BOLDENONE).....	9
2.1. Μελέτες Ανθρώπινης Έκθεσης στην Μπολντενόνη	12
3. ΕΛΕΓΧΟΣ ΝΤΟΠΙΝΓΚ.....	13
3.1. Αναλυτικές Τεχνικές.....	13
3.1.1. Τεχνικές Χρωματογραφίας	13
3.1.2. Φασματομετρία μάζας.....	14
3.2. Βιολογικά Υποστρώματα για την Εκτίμηση της Έκθεσης.....	17
3.2.1. Αίμα	18
3.2.2. Ούρα	18
3.3. Μη Συμβατικά Βιολογικά Υποστρώματα	19
4. Η ΤΡΙΧΑ ΣΤΗΝ ΒΙΟΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ ΞΕΝΟΒΙΟΤΙΚΩΝ.....	20
4.1. Ανατομία της Τρίχας.....	21
4.2. Στιβάδες της Τρίχας	22
4.3. Τύποι Τριχών	23
4.4. Μηχανισμοί Εναπόθεσης Ουσιών στην Τρίχα	23

5. ΣΚΟΠΟΣ - ΣΤΟΧΟΙ	24
B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	25
1. IN VIVO ΜΕΛΕΤΗ ΚΑΙ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ	26
1.1. Σχεδιασμός και Υλοποίηση της in-vivo Μελέτης	26
1.2. Πρωτόκολλο Δειγματοληψίας Βιολογικών Δειγμάτων	28
2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ	29
2.1. Αντιδραστήρια, Υλικά και Συσκευές	29
2.2. Παρασκευή Πρότυπων Διαλυμάτων και Φορτισμένων Δειγμάτων	30
2.3. Επεξεργασία Δειγμάτων Ούρων	30
2.4. Επεξεργασία Δειγμάτων Αίματος	31
2.5. Επεξεργασία Ιστών	32
2.6. Επεξεργασία Δειγμάτων Τρίχας	32
3. ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ	34
3.1. Υγρή Χρωματογραφία	34
3.2. Φασματομετρία Μαζών	34
Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	37
1. ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑΣ	38
1.1. Γραμμικότητα και Ευαισθησία Οργάνου	38
1.2. Γραμμικότητα Μεθόδου	39
1.3. Όριο Ανίχνευσης (LOD) και Όριο Ποσοτικοποίησης (LOQ)	40
1.4. Ανάκτηση	41
1.5. Ακρίβεια και Επαναληψιμότητα	42
2. ΕΠΙΠΕΔΑ ΜΠΟΛΑΝΤΕΝΟΝΗΣ ΚΑΙ ΤΟΥ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΗ ΤΗΣ ΣΤΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ	43
2.1. Συγκεντρώσεις στα Ούρα	44

2.2. Συγκεντρώσεις στο Αίμα.....	47
2.3. Συγκεντρώσεις στην Τρίχα.....	48
2.4. Συγκεντρώσεις στους Ιστούς.....	49
Δ. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	51
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	53
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	59
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι	60
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ.....	62
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ	63

A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Σύμφωνα με ορισμούς που έχουν δοθεί, Τοξικολογία είναι η επιστήμη που ασχολείται με τη μελέτη των ανεπιθύμητων ενεργειών των χημικών ουσιών στους ζωντανούς οργανισμούς. Οι ανεπιθύμητες αυτές επιδράσεις - βλάβες ποικίλλουν και διακρίνονται σε θανατηφόρες, βαριές, μέσης βαρύτητας, ελαφρές.

Η Τοξικολογία υποδιαιρείται σε επιμέρους κλάδους ένας από τους οποίους είναι και η Αναλυτική Τοξικολογία. Ο κλάδος αυτός χρησιμοποιεί τα εργαλεία της αναλυτικής χημείας για την ποιοτική και ποσοτική εκτίμηση των χημικών ουσιών που μπορούν να επιδράσουν δυσμενώς πάνω σε ζωντανούς οργανισμούς. Ένας άλλος κλάδος της είναι η Δικαστική Τοξικολογία κατά την οποία γίνεται χρήση της Τοξικολογίας για δικανικούς σκοπούς. Η συνηθέστερη εφαρμογή της συνίσταται στην αναγνώριση των χημικών ουσιών που ενδεχομένως έχουν προκαλέσει τον θάνατο, σωματικές βλάβες ή υλικές ζημιές (Casarett and Doull, 2015).

Γίνεται σαφές λοιπόν, ότι ο συνδυασμός των διαφόρων κλάδων της Τοξικολογίας είναι δυνατόν να προσφέρει χρήσιμα οφέλη στην κοινωνία. Έτσι τεχνικές και μέθοδοι της Αναλυτικής Τοξικολογίας μπορούν να χρησιμοποιηθούν υπέρ της Δικαστικής Τοξικολογίας για την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων, την ανάδειξη της αλήθειας και τέλος την απονομή της δικαιοσύνης.

Ένα ζήτημα το οποίο απασχολεί όλο και περισσότερο τη δικαιοσύνη, λόγω των πολλαπλών κρουσμάτων που λαμβάνουν χώρα στην εποχή μας και στο οποίο θα μπορούσαν να συνεισφέρουν οι παραπάνω τεχνικές και μέθοδοι, είναι αυτό της χρήσης των αναβολικών ουσιών εντός του αθλητισμού αλλά και γενικότερα στους χώρους των γυμναστηρίων.

Αρχικά λοιπόν θα πρέπει να τονιστεί ιδιαίτερα, ότι η άθληση πρέπει να θεωρηθεί απαραίτητο όπλο του ανθρώπου, στην προσπάθειά του για ολοκλήρωση. Αυτή ακριβώς ήταν και η οπτική των αρχαίων Ελλήνων, κατά τους οποίους «νοῦς ὑγιής ἐν σώματι ὑγιεῖ», ενώ όσοι όριζαν σαν αυτοσκοπό τη μονόπλευρη καλλιέργεια του σώματος, οι λεγόμενοι «ἀθληταὶ ἐξ επαγγέλματος» γνώριζαν την κατάκριση από τα υψηλότερα πνεύματα του κλασικού κόσμου (Σόλων, Πλάτων, Ευριπίδης).

Στην εποχή μας, χιλιάδες αθλητές σε όλο τον κόσμο χρησιμοποιούν απαγορευμένες ουσίες βοηθούμενοι από άτομα, και ακόμη χειρότερα από επιστήμονες, που κινούνται στο ημίφως του αθλητισμού. Στην απέναντι όχθη, χιλιάδες επιστήμονες είναι ταγμένοι στην αποκάλυψη και καταπολέμηση αυτής της πρακτικής. Χρήμα και ανθρώπινος μόχθος σπαταλούνται

άφθονα σε αυτόν τον ανταγωνισμό. Δυστυχώς, η επιστήμη που βρίσκεται «δίπλα» στον αθλητή, προηγείται της επιστήμης της αποκάλυψης. Όσο η δεύτερη πλευρά τελειοποιεί τα όπλα της, τόσο η πρώτη πλευρά ανακαλύπτει καινούργια, οδηγώντας σε έναν ατέρμονο αγώνα δρόμου.

Ενάντια λοιπόν στις αξίες του Ολυμπισμού και τους δύο βασικούς άξονές του, το «εὖ αγωνίζεσθαι» και την «ευγενή άμιλλα» συνεχίζει να αυξάνεται η χρήση απαγορευμένων ουσιών, με σκοπό την βελτίωση των επιδόσεων των αθλητών. Το γεγονός αυτό λαμβάνει παγκόσμιες διαστάσεις και ταυτόχρονα έχει στιγματίσει τις περισσότερες μεγάλες αθλητικές διοργανώσεις.

Λόγω της μεγάλης έκτασης του φαινομένου αυτού και της ραγδαίας εξάπλωσής του όχι μόνο εντός του αθλητισμού αλλά και σε χώρους γυμναστηρίων (Gosetti, 2013), κρίνεται αναγκαία η λήψη μέτρων για τον περιορισμό του. Γεγονός που αποδεικνύει τα παραπάνω αποτελεί η έγκυρη επιστημονική έρευνα η οποία πραγματοποιήθηκε σε 5 Ευρωπαϊκές χώρες (Ελλάδα, Κύπρο, Γερμανία, Ιταλία και Ηνωμένο Βασίλειο), χρηματοδοτείται από την Ευρωπαϊκή Ένωση και συντονίζεται για την Ελλάδα από το Τμήμα Επιστήμης Φυσικής Αγωγής και Αθλητισμού (ΤΕΦΑΑ) του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης στο πλαίσιο του προγράμματος «SAFE YOU» (Strengthening the Anti-Doping Fight in Fitness and Exercise in Youth). Το «SAFE YOU» αποτελεί ερευνητικό πρόγραμμα που στοχεύει στην καταπολέμηση του ντόπινγκ σε χώρους αθλητισμού αναψυχής, και σε αυτό συμμετείχαν: το Πανεπιστήμιο Κίνγκστον του Λονδίνου, το Πανεπιστήμιο της Ρώμης Foro Italico, το Πανεπιστήμιο του Πότσταμ και ο Εθνικός Οργανισμός Αντιντόπινγκ της Γερμανίας, το Ελληνικό υπουργείο Πολιτισμού και Αθλητισμού και ο Κυπριακός Οργανισμός Αθλητισμού. Η παραπάνω έρευνα καταλήγει στο εντυπωσιακό συμπέρασμα, ότι ένας στους πέντε αθλούμενους νέους (19,3% του δείγματος) στην Ευρώπη χρησιμοποιεί ή έχει χρησιμοποιήσει στο παρελθόν αναβολικές ουσίες, για να βελτιώσει την απόδοσή του με υψηλότερα ποσοστά χρήσης σε Κύπρο (32,5%) και Ελλάδα (27,0%).

Αναλυτικότερα το δείγμα αποτελούνταν από 915 άτομα από τον χώρο της μαζικής άθλησης (αθλητές και ερασιτέχνες) ηλικίας μεταξύ 16 και 25 ετών, η πλειονότητα των οποίων (584 άτομα) ήταν άνδρες. Τα άτομα αυτά απάντησαν ανώνυμα σε ερωτηματολόγια και βρέθηκε ότι οι πέντε πιο συχνόι λόγοι που αναφέρθηκαν για τη χρήση ουσιών ντόπινγκ ήταν: η ταχύτερη ξεκούραση μετά την άσκηση (40,5%), η αντίληψη ότι η χρήση αναβολικών βοηθά στο να φτάσουν στο επιθυμητό αποτέλεσμα πιο γρήγορα (40,1%), η αντίληψη ότι η χρήση αναβολικών ουσιών αποτελεί αναπόσπαστο μέρος ενός φυσιολογικού προγράμματος άσκησης (38,4%), η περιέργεια (30,9%), καθώς και η λεγόμενη «κοινωνική νόρμα», δηλαδή

το να ακολουθεί κάποιος αυτό που κάνουν οι υπόλοιποι γύρω του (20,7%) (Lazuras et al., 2017).

1.1. Ιστορική Αναδρομή

Παρά την αντίληψη που επικρατεί ότι το ντόπινγκ ως μέσο βελτίωσης της απόδοσης των αθλητών είναι ένα σύγχρονο φαινόμενο, υπάρχουν πολλά παραδείγματα της χρήσης ουσιών από την αρχαία Ελλάδα, όπου γινόταν χρήση εκχυλισμάτων προερχόμενων από διάφορα φυτά, από μανιτάρια ή ακόμη και κατασκευασμένα από τον ίδιο τον άνθρωπο (π.χ. μίγματα κρασιού και βοτάνων). Επίσης χρησιμοποιούνταν διάφορα φυτά προκειμένου οι αθλητές να ανακουφιστούν από τον πόνο ενός τραυματισμού και έτσι να συνεχίσουν να αγωνίζονται. Επιπλέον, αναφέρεται ότι Ρωμαίοι μονομάχοι χρησιμοποιούσαν αδιευκρίνιστα διεγερτικά για να ξεπεράσουν την κούραση.

Η χρήση μεθόδων ντόπινγκ γίνεται ευρέως γνωστή τον 19^ο αιώνα, καθώς κρούσματα εμφανίζονται σε όλους τους κλάδους του αθλητισμού. Το 1865 αναφέρονται περιστατικά ντόπινγκ σε κολυμβητικούς αγώνες στο Άμστερνταμ. Το 1879 γίνεται γνωστή η χρήση μιγμάτων με βάση την καφεΐνη από Γάλλους κολυμβητές. Το 1886 καταγράφεται ο πρώτος θάνατος του αθλητή Linton, κατά τη διάρκεια του ποδηλατικού αγώνα στο Παρίσι από υπερβολική δόση καφεΐνης. Το 1904 ο νικητής μααραθωνοδρόμος του St. Louis, Tom Hicks καταρρέει στη γραμμή τερματισμού μετά από λήψη στρυχνίνης και κονιάκ και παραλίγο να χάσει τη ζωή του. Μια νέα εποχή για το ντόπινγκ ξεκινά τη δεκαετία του 1950 όπου εμφανίζεται η χρήση των αναβολικών στεροειδών. Η Ολυμπιακή ομάδα της Σοβιετικής Ένωσης είναι αυτή που κάνει πρώτη χρήση ανδρικών ορμονών ώστε οι αθλητές της να αυξήσουν τη δύναμη και την αντοχή τους. Αργότερα με την πτώση του τείχους του Βερολίνου, γίνεται γνωστό το κυβερνητικό πρόγραμμα της Ανατολικής Γερμανίας για τη βελτίωση της απόδοσης των νέων αθλητών μέσω της χορήγησης στεροειδών και άλλων φαρμάκων. Ήταν αναμενόμενο λοιπόν, το φαινόμενο αυτό να επηρεάσει και τους Ολυμπιακούς Αγώνες. Έτσι το 1960 εντοπίστηκαν αμερικανοί αθλητές ως οι πρώτοι που έκαναν χρήση αναβολικών. Επίσης αναφορές για χρήση απαγορευμένων ουσιών υπάρχουν για τους Ολυμπιακούς Αγώνες του Τόκιο το 1964 αλλά και του Μεξικού το 1968, με αποκορύφωμα τους Αγώνες του Μονάχου το 1972, οι οποίοι πέρασαν στην ιστορία των Αγώνων ως οι «Ολυμπιακοί Αγώνες των Αναβολικών».

Γίνεται πλέον σαφές, εκείνη την εποχή, η ανάγκη λήψης μέτρων για την αντιμετώπιση του εκτεταμένου αυτού φαινομένου. Έτσι το πρώτο νομοθετικό πλαίσιο για την

καταπολέμηση της χρήσης φαρμάκων στον αθλητισμό θεσπίστηκε από τη Γαλλία το 1963 και στη συνέχεια το 1965 από το Βέλγιο. Το 1967 ιδρύεται η Ιατρική Επιτροπή της Διεθνούς Ολυμπιακής Επιτροπής (IOC) και ο έλεγχος των αθλητών για χρήση απαγορευμένων ουσιών αρχίζει το 1968 στους Ολυμπιακούς Αγώνες της Πόλης του Μεξικό. Παρά τη θέσπιση νομοθεσίας από τους αρμόδιους φορείς, αποδείχθηκε ότι ο έλεγχος κατά τη διάρκεια των αγώνων είναι αναποτελεσματικός για τις ουσίες μακράς διάρκειας όπως για παράδειγμα των αναβολικών, διότι η βελτίωση των επιδόσεων των αθλητών παρέμενε για αρκετό χρόνο μετά την αποβολή της ουσίας. Έτσι αποφασίστηκε οι έλεγχοι ντόπινγκ να πραγματοποιούνται και εκτός αγώνων (Baron et al., 2007). Σημαντική εξέλιξη ενάντια στη μάχη κατά του ντόπινγκ το 1988 θεωρήθηκε η αφαίρεση του χρυσού μεταλλίου που κατέκτησε ο δρομέας Ben Jonson στους Ολυμπιακούς Αγώνες της Σεούλ, λόγω της χρήσης της αναβολικής ουσίας στανοζολόλης (Muller, 2010). Το 1999 ιδρύεται στη Λωζάννη ο Παγκόσμιος Οργανισμός Αντι-Ντόπινγκ με αποστολή την εφαρμογή του Παγκόσμιου Κώδικα Αντι-Ντόπινγκ (Baron et al., 2007). Στην Ελλάδα φορέας για την καταπολέμηση του ντόπινγκ είναι το Εθνικό Συμβούλιο Καταπολέμησης Ντόπινγκ (Ε.Σ.Κ.Α.Ν.) [1].

1.2. Ορισμός Ντόπινγκ

Η λέξη «dope» χρησιμοποιήθηκε από τους λαούς της Αφρικής τον 18ο αιώνα, για την ονομασία των διεγερτικών που χρησιμοποιούσαν στις τελετές τους. Πρόκειται για ένα υψηλής περιεκτικότητας και ιδιόχειρης κατασκευής αλκοολούχο ποτό, το οποίο χρησιμοποιούνταν ως διεγερτικό σε θρησκευτικές τελετές (Muller, 2010).

Σήμερα έχει επικρατήσει ο αγγλικός όρος *doping*, που στα ελληνικά αποδίδεται ως φαρμακοδιέγερση, ο οποίος όμως δεν αποδίδει πλήρως το περιεχόμενο του αντίστοιχου αγγλικού. Ο όρος φαρμακοδιέγερση είναι περιοριστικός, καθώς το ντόπινγκ δεν γίνεται μόνο με φάρμακα και δεν προκαλεί απαραίτητα διέγερση. Για το λόγο αυτό έχει υιοθετηθεί και στην ελληνική γλώσσα ο όρος «ντόπινγκ». Με τον όρο αυτό εννοούμε τη χορήγηση σε αθλητή ή τη χρήση από αυτόν, ενός απαγορευμένου μέσου (ουσίας ή μεθόδου), με σκοπό την τεχνητή βελτίωση της αγωνιστικής του ικανότητας, απόδοσης ή διάθεσης, κατά τη διάρκεια των αγώνων ή κατά το στάδιο της προπονητικής προετοιμασίας του.

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Κώδικα Αντι-Ντόπινγκ που ισχύει από την 1η Ιανουαρίου 2015, το ντόπινγκ ορίζεται ως η εκδήλωση μίας ή περισσότερων παραβάσεων κανόνων

αντιντόπινγκ, όπως αυτές ορίζονται στα Άρθρα 2.1 έως 2.10 του Κώδικα (Άρθρο 1 – Ορισμός του Ντόπινγκ).

Τα παρακάτω αποτελούν παραβάσεις κανόνων αντιντόπινγκ (Άρθρο 2 – Παραβάσεις Κανόνων Αντιντόπινγκ):

- Παρουσία απαγορευμένης ουσίας ή μεταβολιτών ή δεικτών της σε δείγμα αθλητή.
- Χρήση ή απόπειρα χρήσης απαγορευμένης ουσίας ή απαγορευμένης μεθόδου από αθλητή.
- Αποφυγή, άρνηση ή μη υποβολή σε δειγματοληψία.
- Μη παροχή πληροφοριών εντοπισμού.
- Παραποίηση ή απόπειρα παραποίησης οποιουδήποτε μέρους του ελέγχου ντόπινγκ.
- Κατοχή απαγορευμένης ουσίας ή απαγορευμένης μεθόδου.
- Διακίνηση ή απόπειρα διακίνησης οποιασδήποτε απαγορευμένης ουσίας ή απαγορευμένης μεθόδου.
- Η εντός αγώνα χορήγηση ή η απόπειρα χορήγησης προς αθλητή οποιασδήποτε απαγορευμένης ουσίας ή απαγορευμένης μεθόδου ή η εκτός αγώνα χορήγηση ή η απόπειρα χορήγησης προς αθλητή οποιασδήποτε απαγορευμένης μεθόδου ή απαγορευμένης ουσίας που απαγορεύεται εκτός αγώνα.
- Συνέργεια.
- Απαγορευμένη σύμπραξη. [2] & [3].

1.3. Απαγορευμένες Ουσίες και Μέθοδοι

1.3.1. Απαγορευμένες Ουσίες

(α) Αναβολικά Ανδρογόνα Στεροειδή (ΑΑΣ)

- Τα εξωγενή ανδρογόνα αναβολικά στεροειδή είναι ουσίες που δεν είναι δυνατό να παραχθούν από τον οργανισμό υπό φυσιολογικές συνθήκες. Παράδειγμα αυτών αποτελούν τα εξής: αιθυλοιστρενόλη (ethylestrenol), γεστρινόνη (gestrinone), μπολαστερόνη (bolasterone), στανοζολόλη (stanozolol), 1-τεστοστερόνη (1-testosterone), τρενμπολόνη (trenbolone).
- Τα ενδογενή ανδρογόνα αναβολικά στεροειδή είναι ουσίες που είναι δυνατό να παραχθούν από τον οργανισμό υπό φυσιολογικές συνθήκες. Κάποια παραδείγματα

αυτών είναι: τεστοστερόνη (testosterone), ανδροστενεδιόλη (androstenediol), 19-νορανδροστενεδιόλη (19-norandrostenediol).

(β) Πενταδικές Ορμόνες, Αυξητικοί Παράγοντες, Συγγενείς Ουσίες και Μιμητές: (π.χ. η ερυθροποιητίνη (EPO), η αυξητική ορμόνη (hGH) και η ινσουλίνη αυξητικού παράγοντα (IGF-1), η χοριακή γοναδοτροπίνη (hCG) στα αρσενικά μόνο, ινσουλίνη κτλ).

(γ) Βήτα-2-Αγωνιστές: (εκτός φορμοτερόλη, σαλβουταμόλη, σαλμετερόλη, τερβουταλίνη επιτρέπεται από εισπνοή μόνο).

(δ) Ορμονικοί και Μεταβολικοί Τροποποιητές: (π.χ. αναστολείς της αρωματάσης, εκλεκτικοί τροποποιητές υποδοχέων οιστρογόνων, μεταβολικοί τροποποιητές κλπ)

(ε) Διουρητικά και άλλοι Παράγοντες Απόκρυψης: (π.χ. αμιλορίδιο, βουμετανίδιο κλπ)

(στ) Τα Διεγερτικά: (π.χ. αμφεταμίνες, η κοκαΐνη, εφεδρίνες, κλπ)

(ζ) Τα Ναρκωτικά: (π.χ. ηρωίνη, μορφίνη, πεθιδίνη, μεθαδόνη κλπ)

(η) Τα Κανναβινοειδή: (π.χ. χασίς, μαριχουάνα)

(θ) Τα Γλυκοκορτικοστεροειδή (π.χ. κορτιζόνη, μεθυλοπρεδνιζολόνη κλπ)

1.3.2. Απαγορευμένες Μέθοδοι

(α) Αύξηση της μεταφοράς οξυγόνου.

(β) Φαρμακολογικός, χημικός και φυσικός χειρισμός.

(γ) Γονιδιακό ντόπινγκ. [4] & [5].

1.4. Αναβολικά Ανδρογόνα Στεροειδή

Τα αναβολικά ανδρογόνα στεροειδή προκύπτουν από τη χημική τροποποίηση του πρόδρομου μορίου της τεστοστερόνης, η οποία είναι η κύρια ανδρική ορμόνη και συντίθεται στα κύτταρα Leydig στους όρχεις (Εικόνα 3). Τα αναβολικά ανδρογόνα στεροειδή προκαλούν ανεπιθύμητες ενέργειες, όπως διαταραχή της ενδοκρινικής λειτουργίας και της λειτουργίας του ανοσοποιητικού συστήματος, διαφοροποιήσεις στον υποδόριο ιστό και

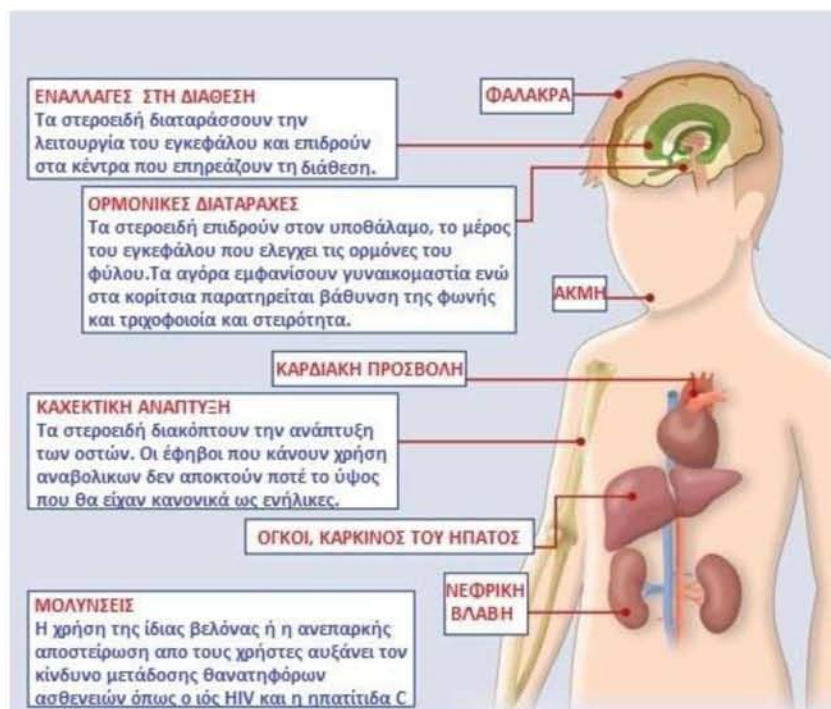
δέρμα, αλλαγές στο αιμοποιητικό σύστημα και την ουρογεννητική οδό (Goldman and Basaria, 2018; Maravelias et al., 2005; Kam and Yarrow, 2005).

Χρησιμοποιούνται κυρίως για να ενισχύσουν τη δύναμη και αντοχή στους σκύλους, τους ίππους και τους αθλητές μέσω της αύξησης της μυϊκής πρωτεϊνικής παραγωγής και είναι συνθετικές ουσίες που σχετίζονται με την πρωταρχική ανδρική ορμόνη, την τεστοστερόνη.

Η τεστοστερόνη παίζει βασικό ρόλο στην ανάπτυξη των αρσενικών αναπαραγωγικών ιστών όπως τους όρχεις και τον προστάτη, στην εκδήλωση των δευτερογενών σεξουαλικών χαρακτηριστικών ενώ προκαλεί αυξημένη μυϊκή και οστική μάζα καθώς και ανάπτυξη των τριχών του σώματος (Mooradian et al., 1987). Επιπλέον, η τεστοστερόνη σχετίζεται με την υγεία και την ευημερία (Bassil et al., 2009), καθώς και με την πρόληψη της οστεοπόρωσης (Tuck and Francis, 2009). Τα ανεπαρκή επίπεδα τεστοστερόνης μπορεί να οδηγήσουν σε ανωμαλίες όπως αδυναμία και απώλεια οστικής μάζας. Εκτός όμως από το ρόλο της ως φυσικής ορμόνης, η τεστοστερόνη χρησιμοποιείται ως φάρμακο για τη θεραπεία χαμηλών επιπέδων τεστοστερόνης στους άνδρες και τον καρκίνο του μαστού στις γυναίκες. Δεδομένου ότι τα επίπεδα τεστοστερόνης μειώνονται καθώς οι άνδρες μεγαλώνουν, η τεστοστερόνη χρησιμοποιείται μερικές φορές σε ηλικιωμένους άνδρες για να εξουδετερώσει αυτή την ανεπάρκεια. Χρησιμοποιείται επίσης για την παράνομη ενίσχυση της σωματικής διάπλασης και τη βελτίωση των επιδόσεων των αθλητών (Evans, 2004).

Οι τροποποιήσεις της τεστοστερόνης οδηγούν στην αλλαγή της φαρμακολογικής δράσης της, με αποτέλεσμα τη σύνθεση ενεργών παραγώγων με παρατεταμένη δραστηριότητα *in vivo*, στα οποία η αναβολική δράση υπερτερεί της ανδρογονικής και ελαχιστοποιείται η μετατροπή της σε οιστραδιόλη.

Η κατάχρηση των ΑΑΣ αποτελεί χαρακτηριστικό των τελευταίων χρόνων, έχει αυξηθεί ραγδαία και επεκταθεί σε χώρους πέρα του αθλητισμού για λόγους κοινωνικούς και κοσμητικούς. Η κατάχρηση των ουσιών αυτών μπορεί να οδηγήσει σε σοβαρή και μη αντιστρεπτή καταστροφή των οργάνων. Ανάμεσα στις πιο γνωστές ανεπιθύμητες ενέργειες που έχουν καταγραφεί είναι η μείωση της γονιμότητας, υπέρταση, αθηροσκλήρωση, αύξηση της πηκτικότητας του αίματος, ηπατικά νεοπλάσματα και καρκινώματα, βλάβη τενόντων, ψυχιατρικές και συμπεριφορικές διαταραχές (Oda and El-Ashmawy, 2012).



Εικόνα 1: Επιπτώσεις από την κατάχρηση ΑΑΣ

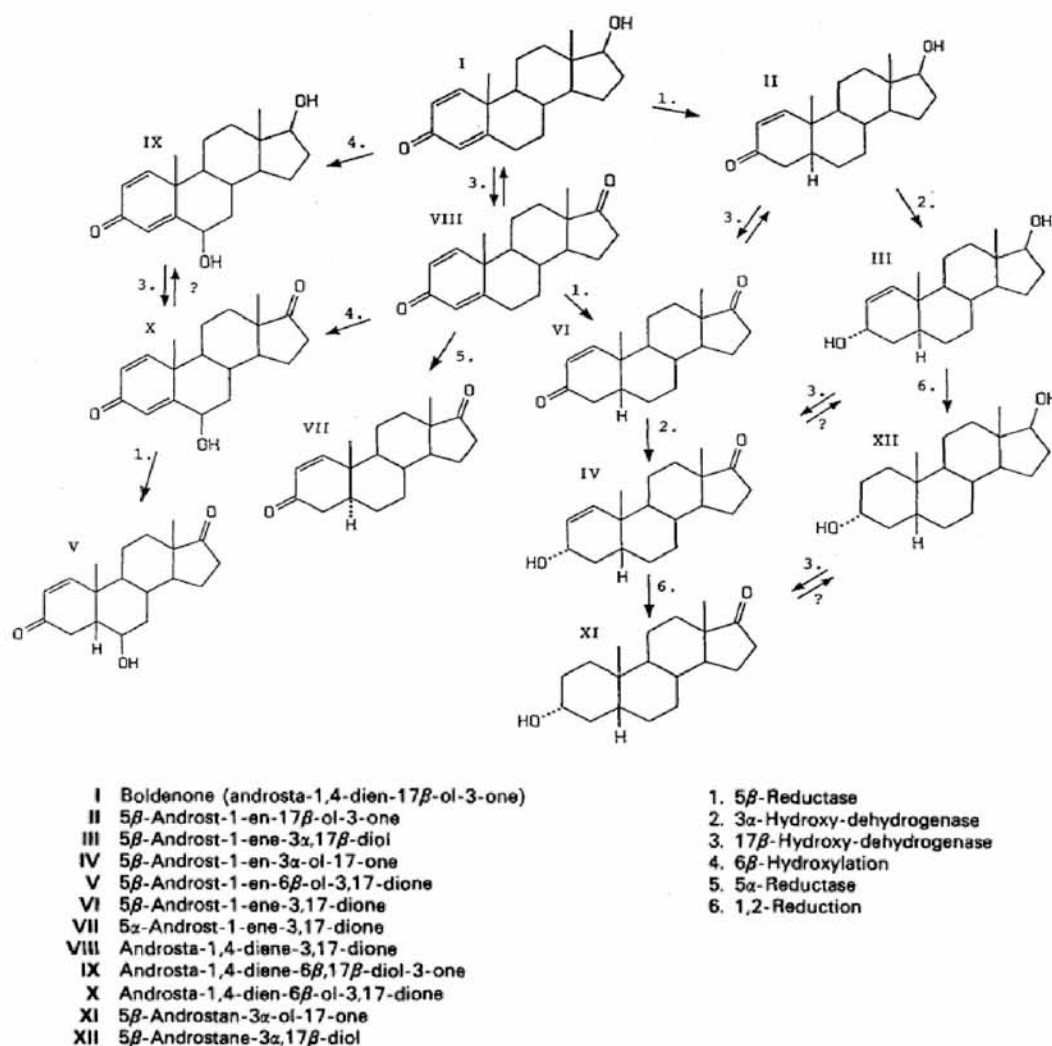
(Πηγή: www.apostoloschronopoulos.gr/analika-i-mastiga-tou-gymnastiriu).

Τα ανδρογόνα αναβολικά στεροειδή συμμετέχουν σε ποικίλες χημικές αντιδράσεις και υφίστανται εκτενείς μετατροπές πριν από την απέκκρισή τους στα ούρα. Τα μεταβολικά μονοπάτια που ακολουθούνται χωρίζονται σε δυο φάσεις: φάση I (functionalization) και φάση II (conjugation) και οδηγούν στην μετατροπή του στεροειδούς σε μορφή λιγότερο τοξική και δραστική και παράλληλα περισσότερο πολική. Οι μετατροπές που υφίστανται τα ΑΑΣ επηρεάζουν τις διαδικασίες ελέγχου ντόπινγκ, καθώς συμβάλλουν στην εκτίμηση του χρόνου χορήγησης του στεροειδούς και της ενδοατομικής διακύμανσης. Γενικότερα οι αντιδράσεις της φάσης I εισάγουν μια νέα λειτουργική ομάδα στο μόριο της ξενοβιοτικής ουσίας, στην περίπτωση που αυτή δεν υπάρχει, ώστε να επακολουθήσουν οι αντιδράσεις σύζευξης της φάσης II και να πραγματοποιηθεί με αυτόν τον τρόπο η απομάκρυνση του φαρμάκου από τον οργανισμό (Gibson and Skett, 1986).

2. ΜΠΟΛΝΤΕΝΟΝΗ (BOLDENONE)

Ένα αναβολικό στεροειδές το οποίο προκύπτει από τη χημική τροποποίηση του πρόδρομου μορίου της τεστοστερόνης (androst-4-ene-17 β -ol-3-one) είναι η μπολντενόνη (boldenone) με χημικό τύπο C₁₉H₂₆O₂ και μοριακό βάρος 286,415 g/mol - PubChem CID: 13308, [6]. Η μπολντενόνη (1,4-androstadiene-17 β -ol-3-one) είναι ένα στεροειδές ανδρογόνο

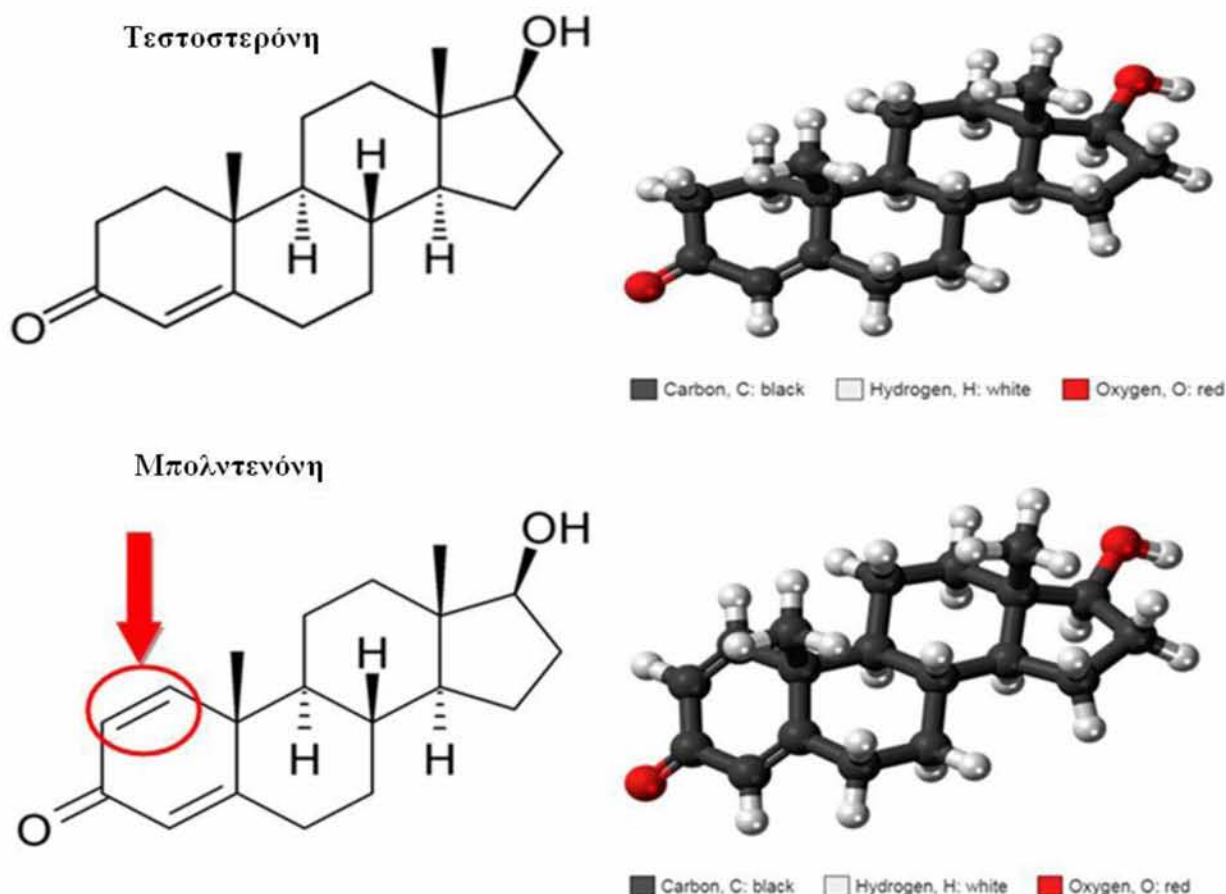
που βελτιώνει την ανάπτυξη και την μετατροπή της τροφής στα παραγωγικά ζώα που προορίζονται για ανθρώπινη κατανάλωση. Η δομή της μοιάζει πολύ με τη δομή της τεστοστερόνης και η διαφορά τους έγκειται στον αριθμό και στη θέση των διπλών δεσμών (Εικόνα 3) (Wu et al., 2015). Η μπολντενόνη έχει δύο ισομερή 17β-μπολντενόνη (androsta-1,4-dien-17β-ol-3-one) και 17α-μπολντενόνη (androsta-1,4-dien-17α-ol-3-one) λόγω της υδροξυλομάδας στη θέση C-17. Η 17β-μπολντενόνη και οι εστέρες της (π.χ. undecylenate και κυπιονικός εστέρας) είναι εμπορικά διαθέσιμοι στο διαδίκτυο σαν αναβολικοί παράγοντες. Η 17α-μπολντενόνη είναι ο κύριος μεταβολίτης της 17β – μπολντενόνης στα ούρα βοοειδών και αλόγων. Άλλοι μεταβολίτες έχουν επίσης ανιχνευθεί στα ούρα βοοειδών όπως οι 1,4-ανδροστενεδιόνη-3,17-διόνη, 5β-ανδροστενε-1-3,17-διόνη, και κάποιοι υδροξυλιωμένοι μεταβολίτες (De Brabander et al., 2004; Sangiorgi et al., 2005; Le Bizec et al., 2006; Ferretti et al., 2007). Συμπερασματικά ο μεταβολισμός της μπολντενόνης (Εικόνα 2) ποικίλει τόσο ανάμεσα στα είδη, όσο και ανάμεσα στα φύλα (De Brabander et al., 2004).



Εικόνα 2: Μεταβολισμός της μπολντενόνης (Schanzert & Donike, 1992).

Αρχικά δημιουργήθηκε για κτηνιατρική χρήση κυρίως για την θεραπεία των αλόγων, με το χαρακτηριστικό όνομα Equipose, ενώ σήμερα χορηγείται παράνομα στους αγωνιστικούς ίππους, ως ενισχυτής ανάπτυξης στις κτηνοτροφικές μονάδες καθώς ενισχύει την ανάπτυξη και την μετατροπή της τροφής στα βοοειδή, με σκοπό να επιτυγχάνεται πιο αποτελεσματική παραγωγή κρέατος. Επίσης λαμβάνεται από bodybuilders σε περιόδους προετοιμασίας για κάποιον αγώνα αλλά και σε μη αγωνιστική περίοδο, καθώς είναι γνωστό ότι αυξάνει την αγγείωση. Η μπολντενόνη αυξάνει το μυϊκό μέγεθος, λόγω της προαγωγής της θετικής ισορροπίας αζώτου, μέσω της ενίσχυσης της παράγωγης πρωτεϊνών και της μείωσης της καταστροφής των πρωτεϊνών, καθώς επίσης προκαλεί κατακράτηση του σωματικού νερού, αζώτου και των ιόντων νατρίου, καλίου, ασβεστίου. Συνεπώς, έχει άμεση και έμμεση επίπτωση στον άνθρωπο: άμεση, μέσω της έγχυσης της ουσίας για την αύξηση της μυϊκής μάζας και έμμεση, μέσω της κατανάλωσης κρέατος που προήλθε από ζώα, στα οποία έγινε χρήση μπολντενόνης (Tousson et al., 2016).

Στις περισσότερες χώρες έχει απαγορευτεί η χρήση ως αναβολικό στεροειδές για ανθρώπινη χρήση και για χρήση σε ζώα που προορίζονται για κατανάλωση, καθώς χρησιμοποιείται μόνο για κτηνιατρική χρήση (Wu et al., 2015). Μέχρι σήμερα ο έλεγχος της παράνομης χρήσης της γινόταν μέσω του προσδιορισμού της 17β - μπολντενόνης ή της 17α - μπολντενόνης στους βρώσιμους ιστούς, στις τρίχες, τα κόπρανα ή τα ούρα. Η μπολντενόνη έχει μεγάλο χρόνο ημίσειας ζωής 14 ημέρες και μπορεί να ανιχνευτεί σε τεστ αναβολικών στεροειδών μέχρι και 1,5 χρόνο μετά. Αυτό συμβαίνει λόγω του μακρού ενδεκυλενικού εστέρα που είναι προσαρμοσμένος σε αυτό το στεροειδές. Αυτό έχει αποδειχτεί μέσω της βιομεταφοράς κάτω από αερόβιες συνθήκες μιας πρόδρομης ουσίας σε α - μπολντενόνη στα δείγματα ξηρών κοπράνων.



Εικόνα 3: Δομική διαφορά των μορίων της τεστοστερόνης και της μπολντενόνης. (Πηγή: [7]&[8])

2.1. Μελέτες Ανθρώπινης Έκθεσης στην Μπολντενόνη

Η μπολντενόνη, όπως και αρκετά άλλα αναβολικά στεροειδή έχει ανιχνευθεί στον ανθρώπινο μυελό των οστών, στα ούρα και στην τρίχα. Περιπτώσεις καρδιακής ανακοπής σε νεαρά άτομα συνδέονται με την χρήση αναβολικών στεροειδών περισσότερο από το ιστορικό καρδιαγγειακής νόσου. Υπό αυτές τις συνθήκες και προκειμένου να διαπιστωθεί αν η νόσος οφείλεται σε τοξικά αίτια είναι απαραίτητο να διενεργούνται εγκληματολογικές και τοξικολογικές αναλύσεις. (Fineschi et al., 2001, 2007; Hourigan et al., 1998). Οι περιπτώσεις ενός αθλητή άρσης βαρών 36 ετών που βρέθηκε νεκρός στο διαμέρισμά του και ενός άνδρα 22 ετών που βρέθηκε αναισθητός στο σπίτι του συνδέονται με την λήψη αναβολικών στεροειδών (Fabresse et al., 2017). Και στις δυο περιπτώσεις αναβολικά σκευάσματα βρέθηκαν κοντά στο σώμα τους και αποτέλεσαν ευρήματα της ιατροδικαστικής αυτοψίας. Άλλα ευρήματα της νεκροψίας ήταν πνευμονικό και εγκεφαλικό οίδημα, κυκλοφορική καταπληξία, εκχυμώσεις και σημεία ασφυξίας που συνηγορούν για ένα τοξικό θάνατο. Και

στις δυο περιπτώσεις βρέθηκαν υπερτροφία της αριστερής καρδιακής κοιλίας, ίνωση του μυοκαρδίου, ατροφία των όρχεων και γυναικομαστία. Οι τοξικολογικές αναλύσεις έγιναν και στις δυο περιπτώσεις σε δείγματα ούρων και αίματος, ενώ στη δεύτερη περίπτωση έγιναν και σε δείγμα τρίχας. Στο αίμα του ατόμου της πρώτης περίπτωσης εκτός από μολντενόνη (22,4 ng/ml) ανιχνεύθηκαν σε συγκεντρώσεις μεταξύ 6-257 ng/ml οι: ανδροστενεδιόνη, τεστοστερόνη, σταμποζολόλη, νανδρολόνη, τρεμπολόνη και ταμοξιφένη. Όλες οι ουσίες συμπεριλαμβανομένης της επιτεστοστερόνης ανιχνεύθηκαν στα ούρα σε συγκέντρωση 36 - 1406 ng/ml. Στη δεύτερη περίπτωση η μολντενόνη δεν ανιχνεύθηκε σε κανένα βιολογικό δείγμα. Σε δείγματα τρίχας οι ουσίες αυτές ανιχνεύονται σε υψηλότερα επίπεδα, πράγμα που καθιστά το συγκεκριμένο υπόστρωμα ένα χρήσιμο εργαλείο στην ανάδειξη πρόσφατης και παλιότερης έκθεσης σε αυτούς τους τοξικούς παράγοντες. Σε άλλες μελέτες έχει ανιχνευθεί σε δείγμα τρίχας σε συγκεντρώσεις 7 pg/mg, 25 pg/mg και 1270 pg/mg (Kintz et al., 2014).

3. ΕΛΕΓΧΟΣ ΝΤΟΠΙΝΓΚ

3.1. Αναλυτικές Τεχνικές

3.1.1. Τεχνικές Χρωματογραφίας

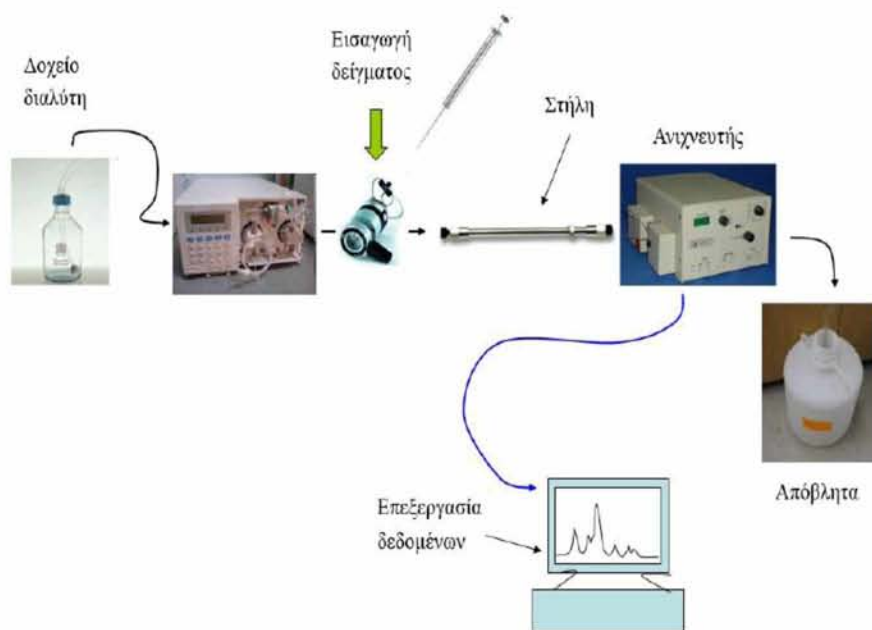
Η βιοανάλυση είναι ένας τομέας της Αναλυτικής Χημείας, με ραγδαία εξέλιξη τα τελευταία χρόνια. Οι βιοαναλυτικές τεχνικές αφορούν όλα τα αναλυτικά προβλήματα, τα οποία σχετίζονται με ποιοτική και ποσοτική ανάλυση συστατικών βιολογικών υγρών και δειγμάτων και στον προσδιορισμό τόσο μικρών μορίων π.χ. φαρμάκων και των μεταβολιτών τους, όσο και μακρομορίων π.χ. πρωτεΐνες και πεπτίδια (Núñez et al., 2013).

Στον τομέα αυτό οι χρωματογραφικές τεχνικές είναι το κύριο αναλυτικό, αλλά και παρασκευαστικό εργαλείο. Έτσι χρησιμοποιούνται ευρέως στην παρακολούθηση της θεραπευτικής δράσης των φαρμάκων, όπως είναι τα αντιβιοτικά και τα αντικαταθλιπτικά (Therapeutic Drug Monitoring), στη φαρμακοκινητική, στις μελέτες βιοϊσοδυναμίας, σε τοξικολογικές μελέτες, στην εγκληματολογία (Forensic Medicine/Toxicology), στον έλεγχο ανίχνευσης απαγορευμένων ουσιών στον αθλητισμό (Anti-doping Control) αλλά και σε επιδημιολογικές και περιβαλλοντικές μελέτες.

Οι συνήθεις αναλυτικές τεχνικές, οι οποίες χρησιμοποιούνται στις αναλύσεις βιολογικών δειγμάτων είναι η Υγρή Χρωματογραφία (Liquid Chromatography-LC, High Pressure/Performance Liquid Chromatography-HPLC (Samanidou and Nazyropoulou, 2013),

Ultra-performance Liquid Chromatography-UPLC (Swartz M, 2005), η Αέρια Χρωματογραφία (Gas Chromatography-GC) και η Χρωματογραφία υπερκρίσιμου ρευστού (Supercritical Fluid Chromatography-SFC), οι οποίες χρησιμοποιούνται ως επί το πλείστον συζευγμένες με φασματομετρία μάζας (mass spectrometry, MS) (Θεοδωρίδης, 2015).

Μία τυπική διάταξη υγρού χρωματογράφου υψηλής πίεσης φαίνεται παρακάτω στην Εικόνα 4.



Εικόνα 4: Τυπική διάταξη υγρού χρωματογράφου υψηλής πίεσης (Πηγή: Θεοδωρίδης, 2015. Σελ. 185).

3.1.2. Φασματομετρία μάζας

Φασματομετρία μάζας ονομάζεται η αναλυτική τεχνική κατά την οποία τα μόρια (συστατικά) ενός δείγματος μετατρέπονται σε ταχύτατα κινούμενα ιόντα και στη συνέχεια διαχωρίζονται σε σχέση με το λόγο της μάζας προς το φορτίο τους (m/z). Η φασματομετρία μαζών είναι από τις πλέον διαδεδομένες τεχνικές ανάλυσης σε πολλούς τομείς τεχνολογίας και έρευνας και προσφέρει πληροφορίες για:

- (α) την ποιοτική και ποσοτική σύσταση αγνώστων μιγμάτων,
- (β) τη χημική δομή πολύ μεγάλου αριθμού ενώσεων,
- (γ) την παρουσία και το ποσοστό ισοτόπων,
- (δ) τη δομή και σύσταση επιφανειών με μορφή απεικόνισης (MS Imaging).

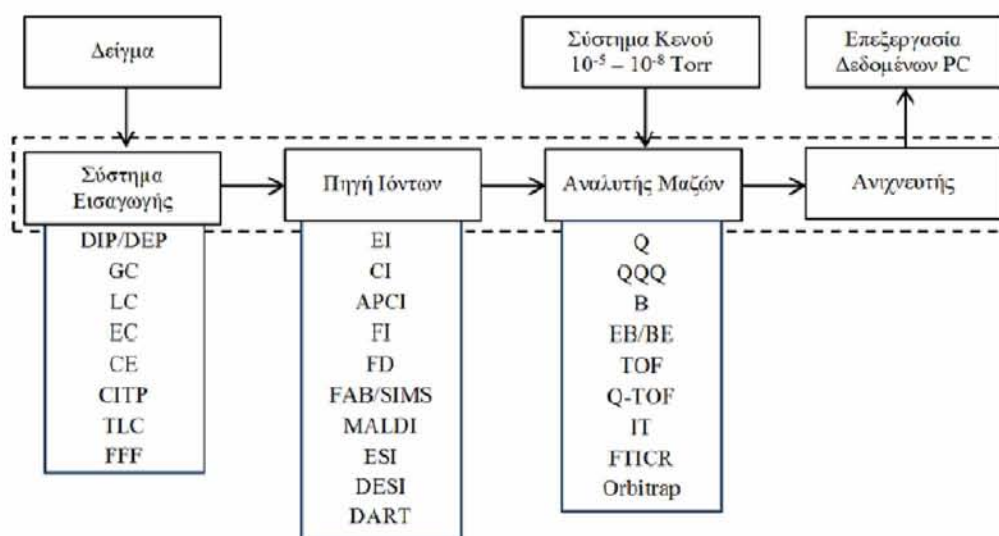
Η δυναμική της φασματομετρίας μαζών στη βιοανάλυση θα μπορούσε να αποδοθεί στις εξής ιδιότητες:

(α) τη μεγάλη εκλεκτικότητα που επιτυγχάνεται με την ακριβή μέτρηση των σχετικών μοριακών μαζών, γεγονός που επιτρέπει την απόλυτη ταυτοποίηση ενώσεων ακόμη και σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις. Η δυνατότητα αυτή έχει ως αποτέλεσμα την απόλυτη κυριαρχία των τεχνικών LC-MS στον έλεγχο τοξικότητας μεταβολισμού φαρμάκων και φαρμακοκινητικής, στη φαρμακευτική βιομηχανία (99% των εφαρμογών είναι σε LC-MS ήδη από το 2008) (Niessen, 1999). Αντίστοιχη είναι η εφαρμογή της MS σε περιπτώσεις ελέγχου απαγορευμένων ενώσεων π.χ. anti-doping, έλεγχος ναρκωτικών κ.ά.

(β) την πολύ υψηλή ευαισθησία, που φτάνει έως τα 10^{-18} mol.

(γ) το γεγονός ότι η φασματομετρία μαζών μπορεί θεωρητικά να δράσει ως ολικός ανιχνευτής (universal detector) και επομένως, να εφαρμοστεί για την ανάλυση οποιασδήποτε ένωσης (Θεοδωρίδης, 2015).

Ένας τυπικός φασματογράφος μαζών απεικονίζεται στην παρακάτω Εικόνα 5.



Εικόνα 5: Σχηματικό διάγραμμα των τμημάτων ενός φασματογράφου μαζών με τις συντομογραφίες των κυριότερων τεχνικών κάθε σταδίου (Πηγή: Θεοδωρίδης, 2015. Σελ. 204).

Η φασματοσκοπία μαζών δεν είναι απλά μια τεχνική ανίχνευσης. Είναι όπως προαναφέρθηκε μια ακόμη διαχωριστική τεχνική, η οποία στηρίζεται σε διαφορετική φυσική ιδιότητα για να επιτευχθεί διαχωρισμός. Ενώ η HPLC στηρίζεται στη συγγένεια του συστατικού προς τη στατική φάση, η MS στηρίζεται στην αναλογία μάζας/φορτίου των ιόντων που παράγονται από τις ενώσεις που προσδιορίζονται. Οι τεχνικές σύνδεσης υγρού

χρωματογράφου HPLC με την τεχνική MS περιλαμβάνουν: 1) μεταφορά, 2) άμεση εισαγωγή υγρού δείγματος, 3) δέσμη σωματιδίων, 4) θερμοψεκασμός, 5) ηλεκτροψεκασμός, 6) ιοντικό ψεκασμό, 7) συνεχή ροή – FAB.

Οι αναλυτές μάζας που χρησιμοποιούνται σε όργανα LC-MS μπορούν να είναι τετράπολα, χρόνου πτήσεως (Time of Flight, TOF) και μαγνητικού τομέα. Οι TOF χρησιμοποιούνται κυρίως για βιολογικά μακρομόρια.

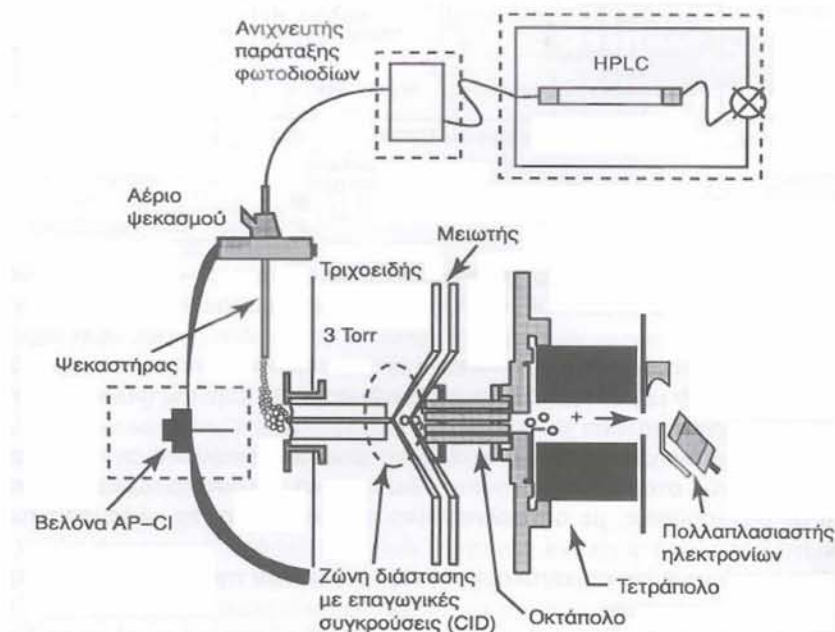
Στη σύζευξη LC-MS πρέπει να γίνει βελτιστοποίηση των λειτουργικών παραμέτρων MS όπως: θερμοκρασία, ροή αερίου ξήρανσης, πίεση ψεκασμού, θέση βελόνας ψεκασμού, διαφορά δυναμικού τριχοειδούς, θερμοκρασία εξάτμισης, ένταση ρεύματος στο χημικό ιονισμό υπό ατμοσφαιρική πίεση.

Δύο πολύ ευρέως χρησιμοποιούμενες πηγές ιονισμού είναι ο ηλεκτροψεκασμός (Electrospray Ionization, ESI) και ο χημικός ιονισμός (Chemical Ionization, CI). Στην πρώτη περίπτωση ο σχηματισμός των ιόντων γίνεται στην υγρή φάση και παράγονται ιόντα πολλαπλού φορτίου, ενώ στο χημικό ιονισμό τα ιόντα σχηματίζονται στην αέρια φάση μέσω ιονισμού βελόνας εκκένωσης και σχηματίζονται μόνο μονού φορτίου ιόντα. Ο ηλεκτρικός ιονισμός εφαρμόζεται για τον προσδιορισμό πολύ πολικών ή ιονικών ενώσεων, μεσαίου έως υψηλού ΜΒ μορίων όπως φαρμακευτικές ουσίες, πρωτεΐνες, συνθετικά πολικά πολυμερή.

Ο χημικός ιονισμός επιλέγεται για την ανάλυση ενώσεων σχετικά χαμηλού ΜΒ (<1.000 dalton) απολικού έως μέτρια πολικού χαρακτήρα.

Η παρακάτω διάταξη LC-MS περιλαμβάνει αερόψυκτο σύστημα αντλίας κενού με θάλαμο ψεκασμού που μπορεί να λειτουργεί, είτε με ηλεκτροψεκασμό, είτε με χημικό ιονισμό. Το επιχρυσωμένο οκτάπολο ραδιοσυχνότητας τοποθετείται πριν το απλό τετράπολο για αύξηση της μεταφοράς των ιόντων και για περιορισμό της διασποράς της ιοντικής ενέργειας.

Εκτός από τις λειτουργικές παραμέτρους πρέπει επίσης να ληφθεί υπόψη η επιφανειακή τάση των διαλυτών και η συγκέντρωση του ηλεκτρολύτη να διατηρείται σε χαμηλά επίπεδα. Σε αντίθετη περίπτωση επηρεάζεται αντιστρόφως ανάλογα η ευαισθησία του MS και είναι απαραίτητη η εφαρμογή υψηλότερου ηλεκτρικού πεδίου για να παραχθεί το απαιτούμενο αερόλυμα. Υψηλό δυναμικό όμως προκαλεί ηλεκτρικές εκκενώσεις και άρα κορυφές που παρεμποδίζουν (Παπαδογιάννης και Σαμανίδου, 2001).



Εικόνα 6: Σχηματική διάταξη σύζευξης HPLC με ανιχνευτή MS.
(Πηγή: Παπαδογιάννης και Σαμανίδου, 2001. Σελ. 450).

3.2. Βιολογικά Υποστρώματα για την Εκτίμηση της Έκθεσης

Τα βιολογικά υποστρώματα είναι δείγματα που προέρχονται από ζωντανούς οργανισμούς π.χ. τον άνθρωπο, τα ζώα, τα φυτά, τους μικροοργανισμούς ή παράγονται με βιοτεχνολογικές μεθόδους και έχουν μεγάλο ενδιαφέρον για παράδειγμα στην Τοξικολογία, σε τοξικολογικές μελέτες, όπως γενοτοξικότητα, οξεία τοξικότητα, χρόνια τοξικότητα, τοξικότητα αναπαραγωγής, ανάπτυξης, καρκινογένεσης αλλά και στη φαρμακευτική σε φαρμακοκινητικές μελέτες, σε κλινικές δοκιμές, μελέτες βιοδιαθεσιμότητας και βιοϊσοδυναμίας.

Τα πλέον χρησιμοποιούμενα βιολογικά δείγματα είναι το αίμα-πλάσμα και τα ούρα τα οποία είναι δείκτες έκθεσης σε κάποιο φάρμακο, συνήθως, τις τελευταίες μέρες πρόσληψής του. Προτιμούνται τα προαναφερόμενα δείγματα, λόγω της υψηλότερης συγκέντρωσης των ενώσεων και των μεταβολιτών τους, αλλά και της εύκολης λήψης τους. Ωστόσο έχουν, το μειονέκτημα της εύκολης νοθείας και της αντικατάστασής τους. Για το λόγο αυτό και άλλα υποστρώματα μπορούν, επίσης, να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες. Έτσι τα βιολογικά δείγματα ταξινομούνται σε συμβατικά και μη συμβατικά – εναλλακτικά.

3.2.1. Αίμα

Το αίμα χαρακτηρίζεται ως το βιολογικό υλικό που προσφέρει την καλύτερη συσχέτιση μεταξύ της συγκέντρωσης μίας ουσίας και της ληφθείσας δόσης. Ο όρος ολικό αίμα αναφέρεται στο αίμα εκείνο, το οποίο συνδυάζεται με έναν αντιπηκτικό παράγοντα κατά τη διαδικασία συλλογής και θεωρείται ένα ειδικά τυποποιημένο προϊόν για μετάγγιση ή για περαιτέρω επεξεργασία για αναλυτικούς σκοπούς.

Το αίμα στη βιοανάλυση έχει τα εξής μειονεκτήματα:

- Οι συγκεντρώσεις των φαρμάκων είναι σε μερικές περιπτώσεις χαμηλές και ανιχνεύσιμες για σύντομο χρονικό διάστημα.
- Δεν υπάρχει πάντα συσχέτιση των κλινικών αποτελεσμάτων με τη συγκέντρωση στο αίμα.
- Σε περιπτώσεις φαρμάκων με μεγάλο ποσοστό κατανομής και πιο συγκεκριμένα σε αυτά που έχουν βασικά δραστικά συστατικά, είναι προτιμότερη η ανάλυση άλλων βιολογικών δειγμάτων, όπως τα ούρα (Θεοδορίδης, 2015).

3.2.2. Ούρα

Ο μεταβολισμός των ενώσεων δημιουργεί πολλά υποπροϊόντα, τα οποία απομακρύνονται από την κυκλοφορία του αίματος και αποβάλλονται με τα ούρα. Ως «ούρα» ορίζεται το σύνολο των υδατοδιαλυτών ουσιών, οι οποίες αποβάλλονται από τους νεφρούς και διαμέσου των υπόλοιπων οργάνων του ουροποιητικού συστήματος αποβάλλονται από το σώμα. Τα ούρα δεν έχουν σταθερή σύσταση, αλλά αποτελούν ένα υδατικό διάλυμα που αποτελείται κατά 95 % από νερό. Στο διάλυμα αυτό περιέχεται ουρία σε συγκέντρωση 9,3 g/L, χλώριο σε συγκέντρωση 1,87 g/L, νάτριο σε συγκέντρωση 1,17 g/L, κάλιο σε συγκέντρωση 0,750 g/L. Το υπόλοιπο ποσοστό είναι διαλυμένα ανόργανα ιόντα και οργανικές ενώσεις, όπως πρωτεΐνες ή ορμόνες, καθώς επίσης και ένα ευρύ φάσμα προϊόντων του μεταβολισμού. Ειδικότερα στα ούρα περιέχονται: ουρία, ουρικό οξύ, κρεατινίνη, αμμωνία, οξαλικό οξύ, διάφορα άλατα (φωσφορικά, θειικά, χλωριούχα κ.ά.), καθώς και άλλες οργανικές ή ανόργανες ουσίες, που αποτελούν παραπροϊόντα του μεταβολισμού.

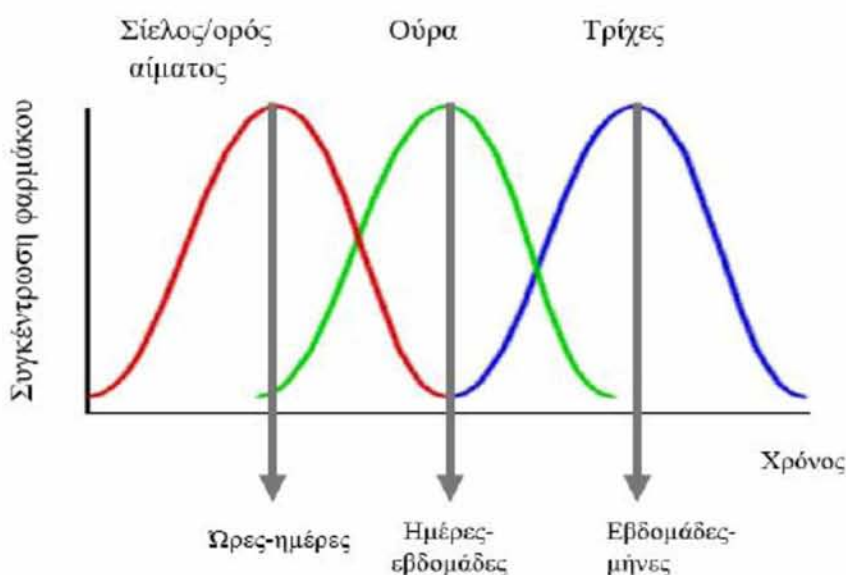
Η δειγματοληψία είναι εύκολη και μη παρεμβατική. Οι συγκεντρώσεις των ουσιών είναι υψηλότερες από ότι στο αίμα. Τα ούρα είναι υδατικό διάλυμα χωρίς πρωτεΐνες. Κατά την ανάλυσή τους ανιχνεύονται τόσο οι μητρικές ουσίες, όσο και οι μεταβολίτες τους.

Η εξέταση ούρων προτιμάται, λόγω της υψηλότερης συγκέντρωσης των ενώσεων και των μεταβολιτών τους και της εύκολης λήψης τους.

Έχουν, όμως, το μειονέκτημα της εύκολης νοθείας και αντικατάστασής τους, καθώς και της βακτηριακής μόλυνσης, εάν δε συντηρηθούν σε χαμηλή θερμοκρασία. Επίσης, σε περίπτωση πρόσφατης λήψης του φαρμάκου, αυτό δεν έχει προλάβει να απεκκριθεί με αποτέλεσμα να μην είναι δυνατή η ανίχνευσή του στα ούρα (Θεοδωρίδης, 2015).

3.3. Μη Συμβατικά Βιολογικά Υποστρώματα

Όταν το αίμα και τα ούρα δεν αναμένεται, πλέον, να περιέχουν την ένωση που αναζητείται και όταν απαιτείται η τεκμηρίωση της χρόνιας λήψης μίας ουσίας (Εικόνα 7), αναζητούνται νέα υποστρώματα, τα οποία έχουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον στην τοξικολογία και γενικότερα στη βιοανάλυση και ονομάζονται «εναλλακτικά». Ως εναλλακτικά θεωρούνται οι τρίχες, οι όνυχες, το εγκεφαλονωτιαίο υγρό, του οποίου η ανάλυση δίνει πληροφορίες για την ποσότητα μίας ουσίας στο κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ) κατά τη στιγμή του θανάτου, τα στοματικά υγρά, ο ιδρώτας, το περικαρδικό υγρό, το οφθαλμικό υγρό, οι ιστοί από όργανα, αδένες, οστά, γαστρικό περιεχόμενο κλπ.



Εικόνα 7: Διάστημα ανίχνευσης ουσιών συγκριτικά στα διάφορα βιολογικά υλικά.
(Πηγή: Θεοδωρίδης, 2015. Σελ. 53).

4. Η ΤΡΙΧΑ ΣΤΗΝ ΒΙΟΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ ΞΕΝΟΒΙΟΤΙΚΩΝ

Η ανάλυση τριχών έχει χρησιμοποιηθεί για την εκτίμηση της έκθεσης σε πληθώρα ξενοβιοτικών ουσιών και πλέον εκτιμάται ως ένα «κλασσικό» υπόστρωμα στις μελέτες βιοπαρακολούθησης (Esteban and Castano, 2009).

Προσφέρει το πλεονέκτημα της μη επεμβατικής δειγματοληψίας, στην οποία δεν απαιτείται η παρουσία εξειδικευμένου προσωπικού, μπορεί να ληφθεί από όλο το σώμα και δεν προκαλεί πόνο ή δυσαρέσκεια. Εάν χρειαστεί, είναι εφικτή η λήψη και δεύτερου δείγματος, το οποίο παρέχει τις ίδιες ακριβώς πληροφορίες με το πρώτο. Τέλος τα δείγματα της τρίχας μπορούν να μεταφερθούν και να αποθηκευθούν χωρίς την ανάγκη ψύξης, ελέγχου pH και προσθήκης συντηρητικών (Gosetti, 2013), καθώς η τρίχα είναι σταθερό βιολογικό υλικό.

Η εναπόθεση των προς ανάλυση ουσιών στην τρίχα, μέσω του κυκλοφορικού έχει συσσωρευτικό χαρακτήρα, γεγονός που επιτρέπει την εκτίμηση της χρόνιας επαναλαμβανόμενης έκθεσης. Επίσης, η ανάλυση τρίχας επιτρέπει την ποιοτική και ποσοτική εκτίμηση της παρελθοντικής έκθεσης μέσω της τμηματικής ανάλυσης, κάτι που είναι αδύνατο να επιτευχθεί με τη ανάλυση υποστρωμάτων, όπως είναι τα ούρα ή το αίμα (Appenzeller and Tsatsakis, 2012; Gambelunghe et al., 2005).

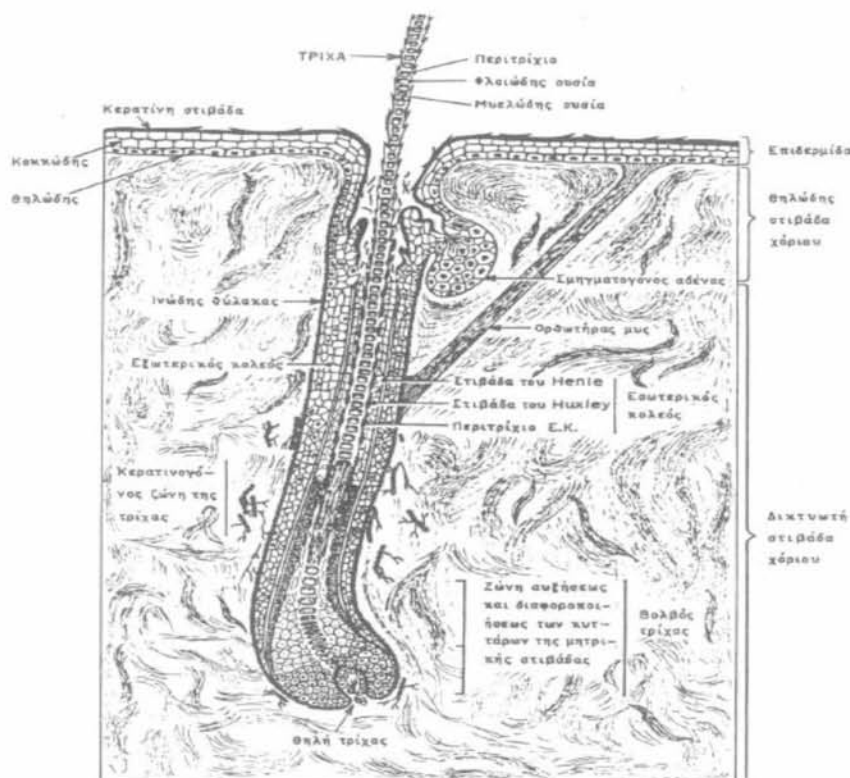
Ακόμη η τρίχα ως ένα μη συμβατικό βιολογικό δείγμα είναι δυνατόν να παρέχει πληροφορίες στον ενδιαφερόμενο για ένα αρκετά μεγάλο χρονικό διάστημα από εβδομάδες έως και μήνες, ανάλογα από το μήκος της τρίχας (Baez et al., 2000; Fabresse et al., 2017). Αυτό συμβαίνει γιατί οι ουσίες που εναποτίθενται στην τρίχα παραμένουν αποθηκευμένες για μακρά χρονικά διαστήματα, παρέχοντας ένα πιο διευρυμένο παράθυρο ανίχνευσης σε σύγκριση με αυτό των συμβατικών βιολογικών δειγμάτων, του αίματος και των ούρων (Rivier, 2000) (Εικόνα 7).

Τέλος το μεγαλύτερο πλεονέκτημα των τριχών είναι ότι οι ουσίες που απορροφούνται παραμένουν παγιδευμένες στο υπόστρωμα για πολύ μεγάλα χρονικά διαστήματα. Αυτό αποδείχθηκε όταν αναλύθηκαν τρίχες από μούμιες που η ηλικία τους υπολογίζεται στα 4.000 περίπου χρόνια και ανιχνεύθηκαν μεταβολίτες της κοκαΐνης. (Baez et al., 2000).

4.1. Ανατομία της Τρίχας

Σε κάποιον μη ειδικευμένο παρατηρητή η τρίχα μπορεί να φανεί σαν μια ομοιογενής δομή, η οποία διαφέρει μεταξύ του μελετώμενου πληθυσμού (π.χ. κουνέλια) μόνο ως προς την ποσότητα και το χρώμα. Στην πραγματικότητα όμως η τρίχα αποτελεί ένα πολύπλοκο τμήμα της ανατομίας του μελετώμενου οργανισμού, του οποίου η φυσιολογία και η λειτουργία είναι μόνο μερικώς κατανοητά. Έτσι χρήσιμο είναι να αναφέρουμε στοιχειωδώς βασικά σημεία της ανατομίας και της φυσιολογίας της τρίχας του κουνελιού προκειμένου να κατανοήσουμε και να αξιολογήσουμε καλύτερα τους παράγοντες που επηρεάζουν τα αποτελέσματα της ανάλυσης τριχών.

Σε κάθε τρίχα διακρίνουμε: τη ρίζα, η οποία βρίσκεται στο βάθος του θύλακα και το σώμα, του οποίου το κατώτερο τμήμα βρίσκεται μέσα στον αυχένα του θύλακα και το ανώτερο εκτός αυτού. Τέλος υπάρχει και το ελεύθερο άκρο της τρίχας, του οποίου η απόληξη έχει σχήμα λογχοειδές. Η ρίζα της τρίχας περιβάλλεται από δυο θύλακες, τον εξωτερικό ή ινώδη και τον εσωτερικό Εικόνα 8 (Rougeot and Thebault, 1985). Ο επιθηλιακός θύλακας αποτελεί συνέχεια της επιδερμίδας και σε αυτόν εκβάλλουν οι σμηγματογόνοι αδένες.

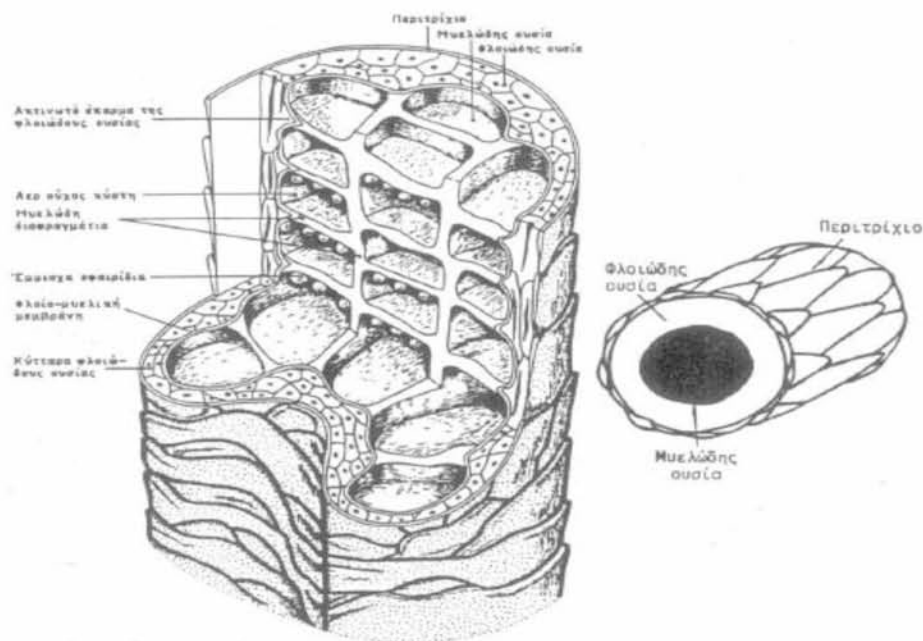


Εικόνα 8: Σχηματογράφημα λεπτής υφής τρίχας και δέρματος κουνελιού.
(Πηγή: Σφαιρόπουλος, 1993. Σελ.115).

4.2. Στιβάδες της Τρίχας

Το ελεύθερο άκρο της τρίχας σε εγκάρσια τομή εμφανίζει από έξω προς τα μέσα τις εξής τρεις στιβάδες Εικόνα 9 (Rougeot and Thebault, 1985). (α) Το περιτρίχιο, το οποίο αποτελείται από ένα στίχο πεπλατισμένων κερατινοποιημένων κυττάρων, που αλληλοκαλύπτονται μερικώς. Η κερατινοποιημένη αυτή στιβάδα δεν περιέχει χρωστικές ουσίες. (β) Η φλοιώδης ουσία ή φλοιός, που αποτελείται επίσης από κερατινοποιημένα επιμηκυσμένα κύτταρα σχήματος ατράκτου, βρισκόμενα σε στενή συνοχή. Η στιβάδα αυτή φέρει κυρίως τη χρωστική ουσία της τρίχας στα έγχρωμα κουνέλια. (γ) Μυελώδης ουσία ή μυελός ή εντεριώνη, η οποία αποτελείται και πάλι από κερατινοποιημένα κύτταρα σε σχήμα πολυεδρικό ή τετράγωνο, που εσωτερικά σχηματίζουν «αερούχες» κύστες στην κορυφή, των οποίων σχηματίζονται έμμεσα σφαιρίδια.

Στο κουνέλι το σύνολο σχεδόν των τριχών είναι εμμύελες και ο περιεχόμενος αέρας τις καθιστά ελαφριές και εύθραυστες, αλλά με αυξημένη τη μονωτική ιδιότητα. Η μυελώδης στιβάδα είναι δυνατόν σε ορισμένες περιπτώσεις να φέρει και χρωστική ουσία στα έγχρωμα κουνέλια.



Εικόνα 9: Σχηματογράφημα λεπτής υφής στηρικτικής τρίχας κουνελιού και εγκάρσια τομή προστατευτικής τρίχας κουνελιού (Πηγή: Σφαιρόπουλος, 1993. Σελ.116; Σπάης, 2013. Σελ. 29).

4.3. Τύποι Τριχών

Το τρίχωμα περιλαμβάνει τρίχες που είναι 3 τύπων:

(α) Στηρικτικές τρίχες (poils de soutien ή jarred tyriques). Είναι οι μακρύτερες και οι μεγαλύτερης διαμέτρου τρίχες και προεξέχουν στο όλο τρίχωμα, ιδιαίτερα στα κουνέλια των φυλών με μέσο ή μεγάλο μήκος τριχώματος.

(β) Καλυπτήριες τρίχες (sous-poils ή duvet ή bourre). Είναι βραχύτερες και λεπτότερες (13-15 μm) από τις στηρικτικές (Σφαιρόπουλος 1982). Το μήκος τους κυμαίνεται από 2 cm ως 3 cm ανάλογα με το γενότυπο του ζώου.

(γ) Ενδιάμεσες τρίχες (poils tecteurs ή barbes). Οι τρίχες αυτές διακρίνονται κυρίως στα ενήλικα κουνέλια και φαίνεται ότι προέρχονται από τις καλυπτήριες που έχουν χάσει μέρος των χαρακτηριστικών τους. Είναι κυματοειδείς λεπτές με διάμετρο 16 μm - 30 μm , ενώ το μήκος τους είναι μεταξύ των δυο παραπάνω τύπων. Η συμμετοχή τους στο όλο τρίχωμα είναι μικρότερη στα μικρής ηλικίας κουνέλια από ότι στα μεγαλύτερης.

4.4. Μηχανισμοί Εναπόθεσης Ουσιών στην Τρίχα

Υπάρχουν δυο κύριοι μηχανισμοί απορρόφησης και παγίδευσης ουσιών στην τρίχα. Ο πρώτος συμβαίνει κατά την κερατινοποίηση των νέων κυττάρων της τρίχας. Οι ουσίες που κυκλοφορούν στο αίμα εισχωρούν στην τρίχα μέσω του θυλακίου και παραμένουν παγιδευμένες σε συγκεκριμένα σημεία της τρίχας. Ο δεύτερος μηχανισμός σχετίζεται με την εξωτερική εναπόθεση ουσιών που βρίσκονται είτε στο περιβάλλον, είτε είναι διαλυμένες στον ιδρώτα ή στο σμήγμα που εκκρίνουν οι σμηγματογόνοι αδένες (Cone, 1996).

Στην παρούσα εργασία μελετάται ο πρώτος μηχανισμός απορρόφησης της χορηγούμενης ουσίας (μπολντενόνη) και της παγίδευσής της στην τρίχα. Πιο συγκεκριμένα οι διάφορες ουσίες και οι μεταβολίτες τους κατανέμονται σε όλο το σώμα του ζώου, κατά κύριο λόγο μέσω της παθητικής διάχυσής τους από το αίμα. Η κατανομή μέσω των μεμβρανών διευκολύνεται από την υψηλή διαλυτότητα μιας ουσίας στα λιπίδια, τη χαλαρή πρόσδεση στις πρωτεΐνες του πλάσματος και τις φυσικοχημικές παραμέτρους που ευνοούν τη μη ιονισμένη μορφή μιας ουσίας στο αίμα. Η διάχυση των ουσιών από τα τριχοειδή αγγεία των θυλακίων στα κύτταρα του υποστρώματος της βάσης του θυλακίου, αναφέρεται σαν ο κύριος μηχανισμός εναπόθεσης ουσιών στις τρίχες. Πιθανόν οι ουσίες προσδένονται στο υπόστρωμα και στις χρωστικές των τριχών. Καθώς τα κύτταρα επιμηκύνονται και παλιώνουν,

νεκρώνονται σταδιακά και σχηματίζουν το στέλεχος της τρίχας με τις ουσίες παγιδευμένες στο υπόστρωμα.

5. ΣΚΟΠΟΣ - ΣΤΟΧΟΙ

Σκοπός της διπλωματικής εργασίας ήταν η διερεύνηση και η αξιολόγηση της καταλληλότητας της τρίχας, ως βιολογικό υπόστρωμα για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό της αναβολικής ουσίας, μολντενόνης. Για το σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκε ελεγχόμενη χορήγηση της ουσίας σε πειραματόζωα (κουνέλια) και μελετήθηκε η αποθήκευση τόσο της μητρικής ουσίας, όσο και του μεταβολίτη της (17α-μολντενόνη) σε διαφορετικά επίπεδα έκθεσης τόσο για εφάπαξ όσο και σε επαναλαμβανόμενη χορήγηση. Παράλληλα με την ανάλυση της τρίχας, πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις των ουσιών στο αίμα, τα ούρα και σε ιστούς από τα πειραματόζωα, με σκοπό να γίνει σύγκριση των αποτελεσμάτων και να αναδειχτεί η καταλληλότητα της τρίχας για την βιοπαρακολούθηση της μολντενόνης.

Β. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. *IN VIVO* ΜΕΛΕΤΗ ΚΑΙ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ

1.1. Σχεδιασμός και Υλοποίηση της *in-vivo* Μελέτης

Στη παρούσα μελέτη εκτίμησης έκθεσης στα ανδρογόνα αναβολικά στεροειδή και συγκεκριμένα της μολντενόνης, ως πειραματόζωα επιλέχθηκαν τα κουνέλια. Σε σχέση με άλλα θηλαστικά, που χρησιμοποιούνται σε πειραματικές μελέτες, εγκλιματίζονται εύκολα σε ελεγχόμενες συνθήκες αρκεί να μην εκτίθενται σε υψηλές θερμοκρασίες. Καταναλώνουν μέχρι 120 ml/kg πόσιμο νερό και αποβάλλουν 50-75 ml/kg ούρων ανά ημέρα. Τα κουνέλια αποτελούν τα πιο διαδεδομένα πειραματόζωα μετά τα ποντίκια και τους αρουραίους. Διαχρονικά εμπλέκονται κυρίως σε δοκιμές τοξικότητας διαφόρων ουσιών καθώς και σε πειράματα εξέλιξης αντιβιοτικών. Παρόλο που στη δεκαετία του '80 προκλήθηκαν αντιδράσεις στη κοινή γνώμη, με αφορμή τις δοκιμές ερεθισμού των οφθαλμών “Draize”, η χρήση τους είναι ακόμα εντατική στις πειραματικές μελέτες, λόγω του χαμηλού κόστους και του εύκολου χειρισμού τους (Suckow et al., 2002).

Για την επίτευξη του στόχου μας και την διεξαγωγή της μελέτης αυτής χρησιμοποιήθηκαν 3 κουνέλια, ηλικίας 3-4 μηνών με δίχρωμο τρίχωμα (λευκό – καφέ) και μέσου βάρους 3kg το καθένα. Τα ζώα αυτά τοποθετήθηκαν, το καθένα ξεχωριστά, σε ειδικούς μεταλλικούς κλωβούς στις εγκαταστάσεις πειραματόζωων του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ηρακλείου (ΠΑΓΝΗ). Τα ζώα βρίσκονταν σε ελεγχόμενες συνθήκες 12ωρου κύκλου ημέρας-νύχτας σε μέση θερμοκρασία 21°C - 23°C. Η τροφή τους ήταν ελεγμένη και κατάλληλη για τη διατροφή των κουνελιών, καθώς επίσης και το νερό που τους χορηγήθηκε ήταν *ad libitum*. Η επιθεώρηση για την κατάσταση της υγείας τους ήταν καθημερινή. Μετά την τοποθέτηση των ζώων στο χώρο, αυτά αφέθηκαν 2 εβδομάδες να εγκλιματιστούν πριν ξεκινήσει η χορήγηση της μολντενόνης.

Τα ζώα χωρίστηκαν σε 2 ομάδες: την πρώτη ομάδα (Group A), εφάπαξ και υψηλής δόσης, και την δεύτερη ομάδα (Group B), χαμηλών και επαναλαμβανόμενων δόσεων. Η πρώτη ομάδα (A) αποτελούνταν από ένα ζώο και χορηγήθηκαν μια (1) μόνο φορά 60 mg/kg μολντενόνης ενώ η δεύτερη ομάδα (B) αποτελούνταν από δύο ζώα και χορηγήθηκαν 10 mg/kg μολντενόνης έξι (6) φορές όπως φαίνεται στον Πίνακα 1. Οι ποσότητες της αναβολικής ουσίας διαλύονταν σε φυσιολογικό ορό και χορηγούνταν ενδομυϊκά. Η χορήγηση διήρκεσε 29 ημέρες. Η συνολική ποσότητα μολντενόνης που έλαβε το ζώο του Group A ήταν 180 mg της ουσίας εφάπαξ, δόση κατά πολύ μικρότερη από την αναφερόμενη στη

βιβλιογραφία θανατηφόρα δόση (LD₅₀) των 3.200 mg/kg για την από του στόματος χορήγηση, ενώ η αντίστοιχη ποσότητα για τα ζώα του Group B ήταν 180 mg ουσίας (30mg x 6 επαναλήψεις). Δεν παρατηρήθηκε κάποια ένδειξη ή συμπτώματα οξείας τοξικότητας από τις χορηγούμενες δόσεις της αναβολικής ουσίας. Το πρόγραμμα και οι ημέρες χορήγησης της ουσίας σε κάθε ομάδα φαίνονται στον Πίνακα 1.

Πίνακας 1. Πρωτόκολλο χορήγησης δόσεων μολντενόνης στα πειραματόζωα.

Ημέρες χορήγησης δόσεων	Ημέρα 0	6 ^η ημέρα	10 ^η ημέρα	16 ^η ημέρα	22 ^η ημέρα	28 ^η ημέρα	30 ^η ημέρα
Group A Εφάπαξ και υψηλή δόση (180 mg)	✓						
Group B Χαμηλές και επαναλαμβανόμενες δόσεις (30 mg κάθε φορά)	✓	✓	✓	✓	✓	✓	Θανάτωση ενός ζώου του GroupB

Η πειραματική διαδικασία χωρίστηκε σε δύο φάσεις: (α) τη φάση χορήγησης που διήρκεσε 29 ημέρες και (β) τη φάση αποτοξίνωσης που διήρκεσε 16 ημέρες και αφορούσε μόνο το ένα ζώο του Group B (συνολική διάρκεια πειράματος 45 ημέρες). Ακολούθησε η δειγματοληψία σύμφωνα με το πρωτόκολλο και την 30^η ημέρα επιλέχθηκε ένα ζώο του Group B για θανάτωση και λήψη ιστών (καρδιά, ήπαρ, νεφροί). Η θανάτωση όλων των πειραματόζωων πραγματοποιήθηκε με ευθανασία. Αρχικά αυτά αναισθητοποιήθηκαν με υποδόρια χορήγηση διαλύματος ξυλαζίνης : κεταμίνης (σκευάσματα Xylapan και Narketan) σε αναλογία όγκων 2:1. Τέλος χορηγήθηκε πεντοβαρβιτάλη στην καρδιά (εμπορικό διάλυμα Dolethal, αντιστοιχία όγκου 5 ml για ζώα μέχρι 5 kg).

Όλοι οι πειραματισμοί πραγματοποιήθηκαν κάτω από τους κανόνες της καλής Κτηνιατρικής Πρακτικής και σύμφωνα με τις οδηγίες και τους κανόνες της ευζωίας των ζώων στην Ελλάδα και την Ευρωπαϊκή Ένωση.

1.2. Πρωτόκολλο Δειγματοληψίας Βιολογικών Δειγμάτων

Η δειγματοληψία των βιολογικών υλικών (ούρα, αίμα, τρίχα) πραγματοποιήθηκε από κάθε ζώο πριν την έναρξη της χορήγησης της αναβολικής ουσίας, δηλαδή την ημέρα (0) έναρξης του πειράματος. Στη συνέχεια οι δειγματοληψίες έγιναν σύμφωνα με το πρωτόκολλο που καταρτίστηκε σύμφωνα με τη βιβλιογραφία και φαίνεται στους Πίνακες 2 και 3.

Πίνακας 2. Χρονοδιάγραμμα δειγματοληψίας βιολογικών υλικών της Ομάδας Α.

Group A	Ημέρα 0	1^η ημέρα	2^η ημέρα	3^η ημέρα	6^η ημέρα	10^η ημέρα	15^η ημέρα	30^η ημέρα	45^η ημέρα
Δειγματοληψία τριχών	✓						✓	✓	✓
Δειγματοληψία ούρων	✓		✓	✓	✓	✓	✓		
Δειγματοληψία αίματος	✓	✓	✓	✓	✓	✓			

Πίνακας 3. Χρονοδιάγραμμα δειγματοληψίας βιολογικών υλικών της Ομάδας Β.

Group B	Ημέρα 0	1^η ημέρα	7^η ημέρα	10^η ημέρα	15^η ημέρα	20^η ημέρα	25^η ημέρα	30^η ημέρα	45^η ημέρα
Δειγματοληψία τριχών	✓				✓			✓	✓
Δειγματοληψία ούρων	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	
Δειγματοληψία αίματος	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	

Τα δείγματα των ούρων συλλέχθηκαν σε ειδικό μεταλλικό δίσκο που βρισκόταν τοποθετημένος κάτω από τους μεταλλικούς κλωβούς των ζώων και κάθε δείγμα αντιστοιχούσε σε ούρα του προηγούμενου 24ώρου. Κατά την έναρξη του 24ώρου ο δίσκος καθαριζόταν και καλύπτονταν με νάιλον. Στο τέλος του 24ώρου λαμβάνονταν το περιεχόμενο του νάιλον και μετά το διαχωρισμό των στερεών από τα υγρά απορρίμματα γινόταν η συλλογή των ούρων, μεταφορά τους σε ειδικούς σωλήνες και φύλαξή τους στο ψυγείο.

Τα δείγματα αίματος λαμβάνονταν με ειδική σύριγγα από την περιφερειακή ωτιαία φλέβα και το αίμα αφού τοποθετούνταν σε ειδικό σωληνάκι με αντιπηκτικό, φυλασσόταν στο ψυγείο.

Τα δείγματα τριχών λαμβάνονταν από την περιοχή της ράχης του ζώου και του λαιμού. Οι τρίχες κόβονταν με ξυράφι ώστε να ληφθούν και τα τμήματα τρίχας που βρίσκονται πολύ

κοντά στο δέρμα του ζώου. Πάντα γινόταν δειγματοληψία από δυο περιοχές ώστε να διασφαλιστεί το γεγονός ότι κι αν ακόμα η ξυρισμένη περιοχή δεν είχε προλάβει να δώσει νέο τρίχωμα, λόγω των συχνών δειγματοληψιών, θα είχαμε πάντα δείγμα. Έτσι το τρίχωμα του ζώου που προερχόταν από την ίδια και ήδη ξυρισμένη περιοχή ονομάστηκε τμηματικό (segment), ενώ το προερχόμενο από διαφορετική και άθικτη περιοχή ονομάστηκε ολικό (total). Τέλος, τα δείγματα των τριχών αφού τοποθετούνταν σε αλουμινόχαρτο σφραγίζονταν σε χάρτινους φακέλους ειδικά σημασμένους και φυλασσόταν σε θερμοκρασία δωματίου, σε σκοτεινό και ξηρό μέρος μέχρι την περαιτέρω ανάλυση.

Τα δείγματα των ιστών (καρδιά, ήπαρ, αριστερός και δεξιός νεφρός) μετά την θανάτωση του ζώου τοποθετήθηκαν και φυλάχθηκαν εντός καταψύκτη σε θερμοκρασία -20°C.

2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

2.1. Αντιδραστήρια, Υλικά και Συσκευές

Αντιδραστήρια

- Μεθανόλη (Sigma, $\geq 99,9\%$)
- Ακετονιτρίλιο εταιρία Roth (Karlsruhe, Germany)
- Boldenone
- Turinabol (LGC Standards)
- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (pH = 7)
- Στερεό μίγμα $\text{NaHCO}_3:\text{Na}_2\text{CO}_3$ αναλογίας 10:1 (Merck, $\geq 99,9\%$)

Υλικά – Εργαστηριακές συσκευές

- Αυτόματες πιπέττες τύπου Finnpiptette-Labsystems 5-40 μL , 20-200 μL , 200-1000 μL .
- Πλαστικά ρύγχι αυτόματων πιπετών.
- Σωλήνες falcon χωρητικότητας 50 ml.
- Γυάλινες πιπέττες Pasteur.
- Διαφανή φιαλίδια αυτόματου εισαγωγέα χωρητικότητας 2 mL.
- Διαφανή Micro-insert χωρητικότητας 0,1 mL με κωνικό πυθμένα.
- Φίλτρα μεγέθους πόρων 0,20 μm (Sarstedt).
- Κλίβανος (Mettler, Μοντέλο 4000).

- Αναλυτικός ζυγός ακριβείας 4^{ου} δεκαδικού ψηφίου (AND, μοντέλο ER-120A) και μέγιστου βάρους ζύγισης 120 gr.
- Φυγόκεντρος (Hettich zentrifygen, μοντέλο Rotofix 32A).
- Αυτόματος αναδευτήρας τύπου Vortex (Velp scientific, μοντέλο Zx3).
- Ανακινήτης (μοντέλο RFL 3260).
- Υδατόλουτρο υπερήχων (Branson, μοντέλο 3510).
- Συσκευή εξάτμισης, η οποία αποτελείται από το σύστημα του διανεμητή αερίου αζώτου και του μεταλλόλουτρου. Τα μεταλλόλουτρα είναι τύπου TECHNE DRI-BLOCK DB-3A, με θερμαντική πλάκα που φέρει οπές κατάλληλες για την υποδοχή των σωλήνων και χρησιμοποιείται για την εξάτμιση της οργανικής φάσης.

2.2. Παρασκευή Πρότυπων Διαλυμάτων και Φορτισμένων Δειγμάτων

Αρχικά παρασκευάστηκαν μεθανολικά πρότυπα διαλύματα της μπολντενόνης, του μεταβολίτη 17α-μπολντενόνης, καθώς και του εσωτερικού προτύπου (turinabol) σε συγκέντρωση 1000 ppm από τα οποία με διαδοχικές αραιώσεις παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα εργασίας (working solutions) σε συγκεντρώσεις 1, 10 και 100 ppm. Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα (standard solutions) με τις ουσίες μπολντενόνη και 17α-μπολντενόνη σε συγκεντρώσεις 0, 50, 100, 250, 500, 1000 ng/ml παρουσία του εσωτερικού προτύπου σε συγκέντρωση 500 ng/ml σε όλα τα διαλύματα. Τέλος όλα τα διαλύματα αποθηκεύτηκαν στους -20°C.

Για την ποσοτικοποίηση των δειγμάτων και την επικύρωση της μεθόδου παρασκευάστηκαν «φορτισμένα» δείγματα (spiked samples) χρησιμοποιώντας ούρα και αίμα ελεύθερα αναβολικών ουσιών (blank), στα οποία προστέθηκε γνωστή ποσότητα από τις ουσίες μπολντενόνη και 17α-μπολντενόνη σε συγκεντρώσεις 0, 10, 25, 50 και 100 ng/ml.

2.3. Επεξεργασία Δειγμάτων Ούρων

Η μέθοδος επεξεργασίας των ούρων είναι μέθοδος που χρησιμοποιείται στο εργαστήριο Τοξικολογίας για τον προσδιορισμό αναβολικών ουσιών στα ούρα. Τα στάδια προετοιμασίας των δειγμάτων ούρων είναι τρία: η υδρόλυση, η εκχύλιση και η ανασύσταση.

- Λήψη 5 ml ούρων από το δείγμα.

- Αραιώσεις δειγμάτων.
- Προσθήκη 1ml ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών, pH=7,0.
- Προσθήκη 40 μl β-γλυκουρονιδάσης (από *Helix Pomatia*) ενζύμου το οποίο διασπά τους δεσμούς.
- Υδατόλουτρο στους $(50 \pm 2)^{\circ}\text{C}$ για 1,5 h και έπειτα μεταφορά των δειγμάτων σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.
- Προσθήκη στα δείγματα 0,5 gr στερεού μίγματος $\text{NaHCO}_3:\text{Na}_2\text{CO}_3$ (10:1), vortex και έλεγχος του pH βρίσκεται εντός περιοχής 9-10.
- Εκχύλιση των ουσιών με προσθήκη 3ml οξικού αιθυλεστέρα (ethyl acetate) για 15 min.
- Φυγοκέντρωση στις 4000 rpm για 4 min, με σκοπό τον διαχωρισμό των δυο φάσεων.
- Μεταφορά της οργανικής φάσης σε καθαρούς δοκιμαστικούς σωλήνες και εξάτμιση υπό ρεύμα αζώτου μέχρι ξηρού.
- Επαναδιαλυτοποίηση σε 100 μl μεθανόλης και ανάδευση στο vortex.
- Μεταφορά του διαλύματος σε vial 2,0 ml με insert για ανάλυση στο σύστημα LC-MS.

2.4. Επεξεργασία Δειγμάτων Αίματος

Για την προετοιμασία των δειγμάτων αίματος ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία (Fabresse et al., 2017):

- Λήψη 500 μl ορού αίματος.
- Προσθήκη 500 ng εσωτερικού προτύπου.
- Προσθήκη 500 μl μεθανόλης.
- Προσθήκη 200 μl υδροξειδίου του νατρίου 0,1 M.
- Προσθήκη 2 ml επτανίου και ανάδευση για 15 min.
- Φυγοκέντρωση των σωλήνων στις 4000 rpm για 10 min.
- Μεταφορά όλης της οργανικής φάσης σε καθαρούς δοκιμαστικούς σωλήνες και εξάτμιση μέχρι ξηρού υπό ρεύμα αζώτου.
- Ανασύσταση των δειγμάτων σε 100 μL μεθανόλη.
- Vortex και μεταφορά του διαλύματος σε vial 2,0 ml με insert για ανάλυση στο σύστημα LC-MS.

2.5. Επεξεργασία Ιστών

Για την επεξεργασία των ιστών αφού έγινε απόψυξή τους, αυτοί τεμαχίστηκαν σε μικρά τεμάχια, ώστε να γίνει ευκολότερη η ομογενοποίησή τους και τοποθετήθηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες. Έτσι τα στάδια προετοιμασίας των ιστών είναι τα ακόλουθα:

- Προσθήκη 2 ml νερού σε 0,5 gr ιστού.
- Φυγοκέντρωση στις 4000 rpm για 5 min.
- Λήψη του υπερκείμενου και μεταφορά σε σωλήνες falcon.

Στη συνέχεια εφαρμόζεται ακριβώς το ίδιο πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε για την ανάλυση των δειγμάτων αίματος (Fabresse et al., 2017) και τέλος εισαγωγή των vials στο χρωματογράφο για ανάλυση.

2.6. Επεξεργασία Δειγμάτων Τρίχας

Από κάθε δείγμα ζυγίστηκαν ποσότητες τριχών όπως αυτές φαίνονται στους παρακάτω Πίνακες 4 έως 6:

Πίνακας 4. Βάρος τριχών των δειγμάτων του Group A.

Group A	Ημέρα 0	15 ^η ημέρα	30 ^η ημέρα	45 ^η ημέρα
Ολικό τρίχωμα (TOTAL)	-	100 mg	90 mg	90 mg
Τμηματικό τρίχωμα (SEGMENT)	-	3,6 mg	2,5 mg	30 mg

Πίνακας 5. Βάρος τριχών των δειγμάτων του Group B1 (πρώτο ζώο της δεύτερης ομάδας).

Group B1	Ημέρα 0	15 ^η ημέρα	30 ^η ημέρα	45 ^η ημέρα
Ολικό τρίχωμα (TOTAL)	100 mg	100 mg	100 mg	100 mg
Τμηματικό τρίχωμα (SEGMENT)	-	10 mg	30 mg	100 mg

Πίνακας 6. Βάρος τριχών των δειγμάτων του Group B2 (δεύτερο ζώο της δεύτερης ομάδας).

Group B2	Ημέρα 0	15η ημέρα	30η ημέρα	45 ημέρα
Ολικό τρίχωμα (TOTAL)	100 mg	94 mg	100 mg	-
Τμηματικό τρίχωμα (SEGMENT)	-	5,6 mg	40 mg	-

Μετά τη ζύγιση τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες και ξεπλύθηκαν με προσθήκη 5 ml νερού και μεταφορά των σωλήνων στο υδατόλουτρο υπερήχων για 3 min. Στη συνέχεια με πιπέττα Pasteur αφαιρείται το νερό. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται και για δεύτερη φορά για την καλύτερη έκπλυση των δειγμάτων. Τέλος ακολουθεί η έκπλυση με μεθανόλη (3 εκπλύσεις). Για την επεξεργασία των δειγμάτων τρίχας ακολουθούμε μέθοδο εκχύλισης υγρού-στερεού παρουσία της μεθανόλης.

Για την εκχύλιση των δειγμάτων τρίχας εργαστήκαμε ως εξής (Strano-Rossi et al., 2013):

- Μεταφορά των δειγμάτων τρίχας σε δοκιμαστικό σωλήνα και προσθήκη 50 μl πρότυπου διαλύματος tuginabol 1 ppm.
- Προσθήκη 2 ml μεθανόλης και τοποθέτηση των δειγμάτων στους υπερήχους για 3h.
- Συλλογή της μεθανολικής φάσης σε νέο επισημασμένο δοκιμαστικό σωλήνα και εξάτμισή της, υπό ρεύμα αζώτου στους 35°C.
- Προσθήκη 1 ml μεθανόλης στην ποσότητα τριχών που βρίσκονται στους δοκιμαστικούς σωλήνες.
- Τοποθέτηση των δειγμάτων στους υπερήχους για 3h.
- Συλλογή της μεθανολικής φάσης και μεταφορά αυτής στο δοκιμαστικό σωλήνα που περιέχει την αντίστοιχη μεθανολική φάση.
- Εξάτμιση της νέας μεθανολικής φάσης, υπό ρεύμα αζώτου στους 35°C.
- Επαναδιαλυτοποίηση των δειγμάτων με προσθήκη 100 μl μεθανόλης και ανάδευση με σύστημα vortex.
- Μεταφορά του διαλύματος σε vial 2,0 ml με insert για ανάλυση στο σύστημα LC-MS

3. ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ

Η ανάλυση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με σύστημα υγρής χρωματογραφίας συζευγμένη με φασματομετρία μαζών (LC–MS 2010 EV) με αυτόματο δειγματολήπτη και λογισμικό LC Solution.

3.1. Υγρή Χρωματογραφία

Στήλη: Discovery HS C18 (25cm x 4,6cm x 5μm) της εταιρίας Supelco

Κινητή φάση: A: νερό με φορμικό οξύ 0,1%, B: ακετονιτρίλιο

Φούρνος: 30°C

Ροή: 0,6 ml/min

Όγκος ένεσης: 10 μL

Πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης: Αρχική συγκέντρωση κινητής φάσης B (t=0) 40%, σταδιακή αύξηση στο 90% (μέχρι t=9 min) και στη συνέχεια 98% (μέχρι t=14 min). Ολοκλήρωση του προγράμματος με συγκέντρωση 40% (μέχρι t=18 min).

Ο χρωματογραφικός χρόνος έκλουσης για την μολντενόνη είναι 9,12 min, για την 17α-μολντενόνη ο χρόνος έκλουσης είναι 9,95 min και η ουσία turinabol, που χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικό πρότυπο (internal standard, IS) εκλούεται σε χρόνο 11,16 min (Πίνακας 7). Χρωματογραφήματα πρότυπων διαλυμάτων και φορτισμένων δειγμάτων φαίνονται στην Εικόνα 10.

3.2. Φασματομετρία Μαζών

Ιονισμός: Θετικός χημικός ιονισμός υπό ατμοσφαιρική πίεση (APCI)

Μέθοδος καταγραφής (acquisition mode): Καταγραφή επιλεγμένων ιόντων (SIM)

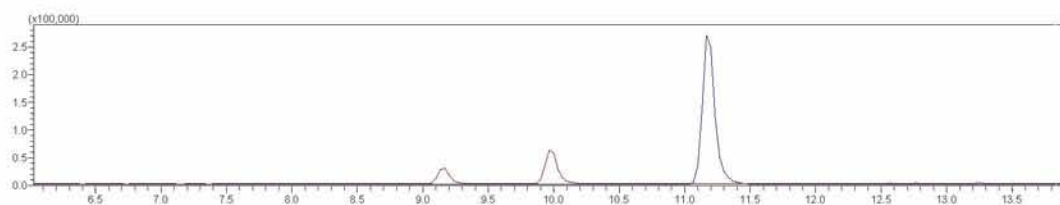
Δυναμικό ανιχνευτή: 1,5 KV

Τα ιόντα που επιλέχθηκαν για τον ποσοτικό και ποιοτικό προσδιορισμό της μολντενόνης έχουν λόγο μάζα/φορτίο (m/z) 328,25 και 269,15, για τον μεταβολίτη 17α-μολντενόνη τα

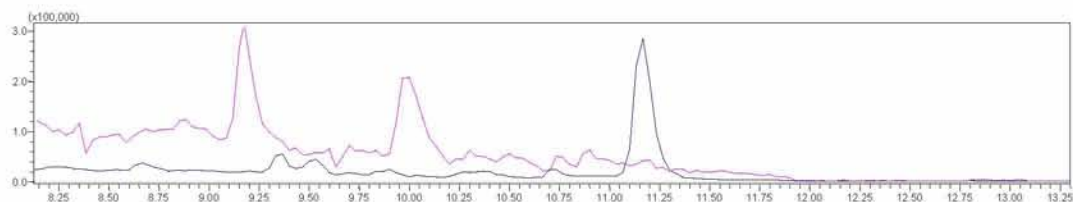
επιλεγμένα ιόντα έχουν λόγο m/z 328,25 και 269,15 και για την ουσία turinabol τα ιόντα που επιλέχθηκαν έχουν λόγο m/z 317,25 και 355,25 (Πίνακας 7).

Πίνακας 7. Χρόνος έκλουσης και επιλεγμένα ιόντα για κάθε ουσία.

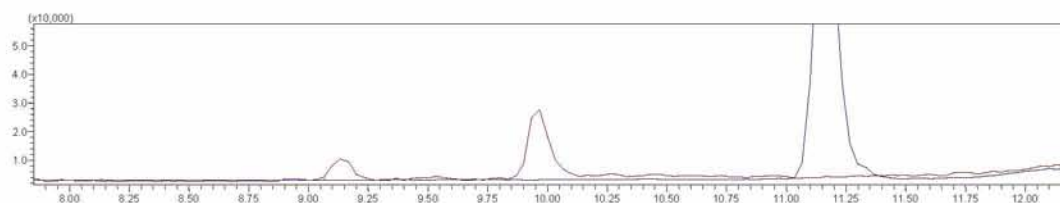
Ουσίες	Χρόνος έκλουσης (min)	Ιόν ποσοτικοποίησης (m/z)	Ιόν Επιβεβαίωσης (m/z)
Μπολντενόνη	9,12	328,25	269,15
17α-μπολντενόνη	9,95	328,25	269,15
Turinabol (IS)	11,16	317,25	355,25



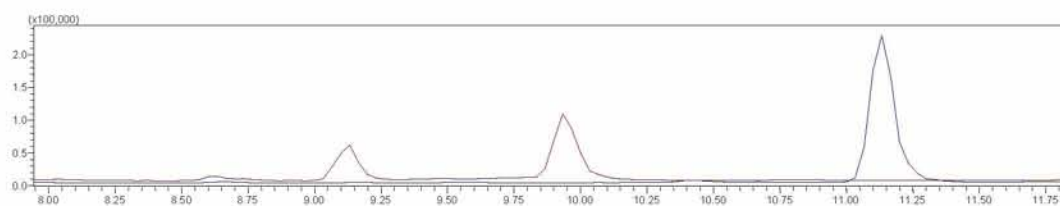
A. Πρότυπο διάλυμα συγκέντρωσης 1 ppm.



B. Φορτισμένο δείγμα ούρων συγκέντρωσης 100 ng/ml.



Γ. Φορτισμένο δείγμα αίματος συγκέντρωσης 200 ng/ml.



Δ. Φορτισμένο δείγμα τρίχας συγκέντρωσης 1 ng/mg.

Εικόνα 10: Χρωματογραφήματα των ουσιών μπολντενόνη (m/z 328.25, 269.15, χρόνος έκλουσης 9,12 min), 17α-μπολντενόνη (m/z 328.25, 269.15, χρόνος έκλουσης 9,95 min) και turinabol (εσωτερικό πρότυπο, IS, m/z 317.25, 355.25, χρόνος έκλουσης 11,16 min).

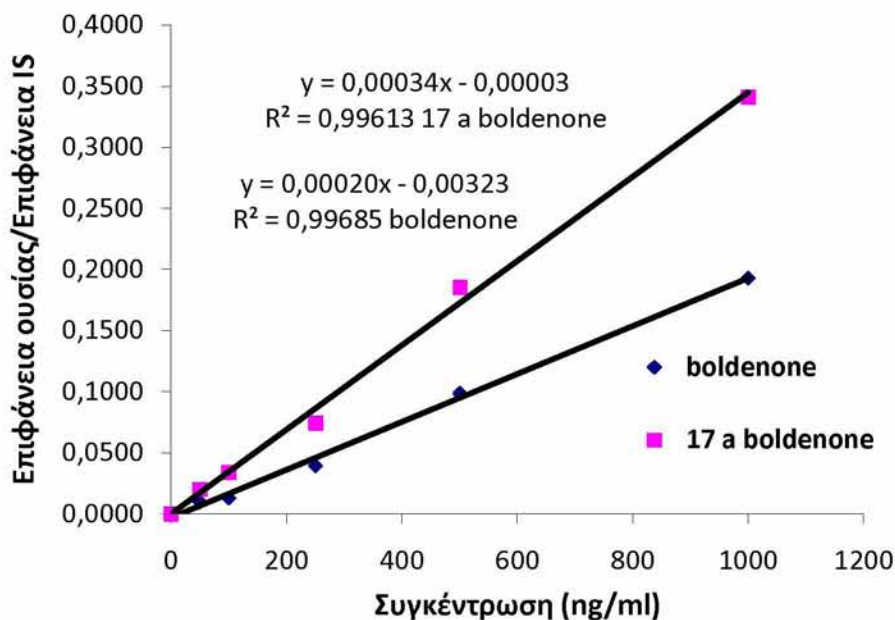
Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

1. ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑΣ

1.1. Γραμμικότητα και Ευαισθησία Οργάνου

Με τον όρο γραμμικότητα του ανιχνευτή εννοούμε την γραμμική απόκριση του ανιχνευτή σε ένα εύρος συγκεντρώσεων. Όταν ο ανιχνευτής έχει γραμμική απόκριση, το εμβαδόν και το ύψος της κορυφής είναι ανάλογα με τη συγκέντρωση της προσδιοριζόμενης ουσίας. Για την κατασκευή της καμπύλης γραμμικότητας χρησιμοποιήθηκαν έξι πρότυπα διαλύματα σε συγκεντρώσεις 0, 50, 100, 250, 500, 1000 ng/ml. Ο συντελεστής r^2 ήταν 0,9961 για τον μεταβολίτη 17α-μπολντενόνη και 0,9969 για την μπολντενόνη. Οι καμπύλες γραμμικότητας του οργάνου φαίνονται στην Εικόνα 11.

Η ευαισθησία του οργάνου προσδιορίζεται με τον υπολογισμό του ορίου ανίχνευσης για κάθε ουσία. Όριο ανίχνευσης του οργάνου περιγράφεται η μικρότερη συγκέντρωση ή η ποσότητα ουσίας που μπορεί να προσδιοριστεί με αξιοπιστία. Ο υπολογισμός έγινε με βάση το λόγο σήμα προς θόρυβο S/N (signal to noise). Το όριο ανίχνευσης για την μπολντενόνη προσδιορίστηκε 2,9 ng/ml ενώ για τον μεταβολίτη της 1,3 ng/ml.

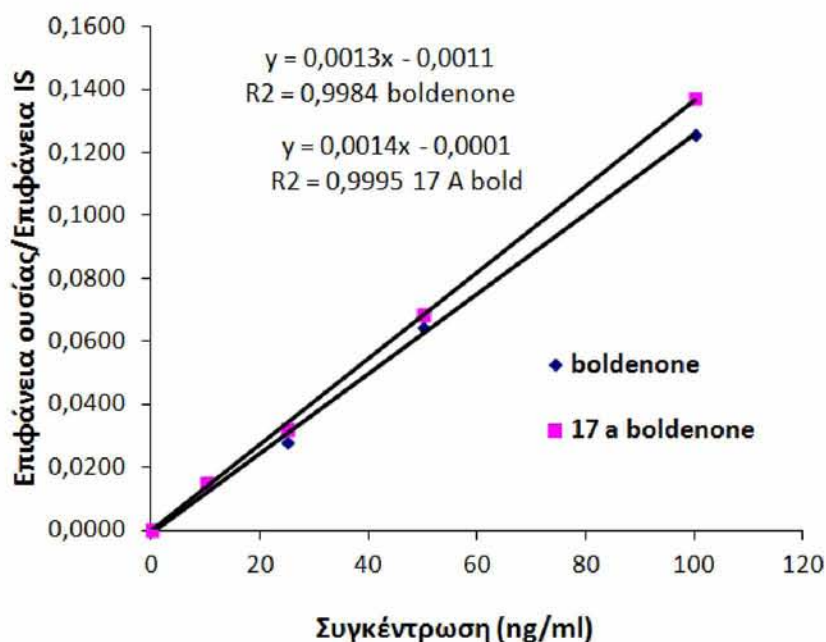


Εικόνα 11: Καμπύλη γραμμικότητας του οργάνου όπως προκύπτει από πρότυπα διαλύματα.

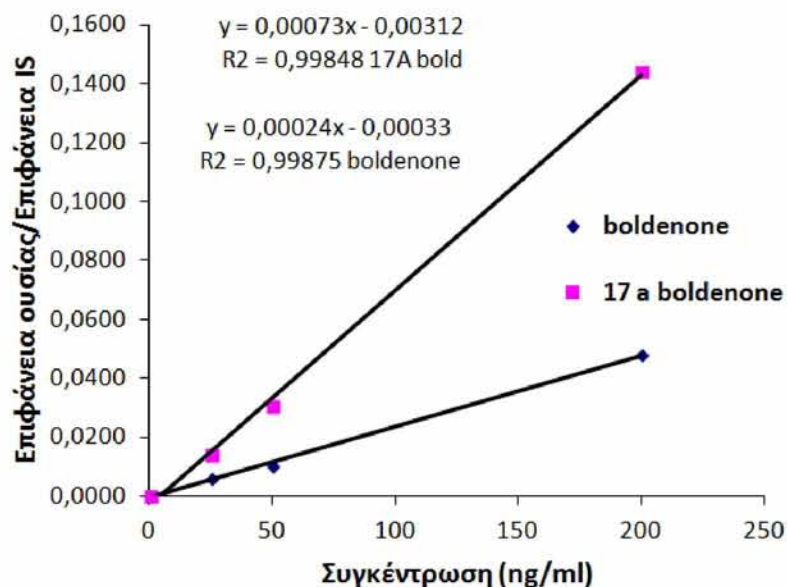
1.2. Γραμμικότητα Μεθόδου

Για την αξιολόγηση της γραμμικότητας της μεθόδου κατασκευάστηκαν καμπύλες αναφοράς για τα φορτισμένα δείγματα. Για κάθε μια από τις προσδιοριζόμενες ουσίες (μπολντενόνη και 17α-μπολντενόνη), υπολογίστηκε ο λόγος της επιφάνειας της χρωματογραφικής κορυφής που αντιστοιχεί στον αναλύτη προς την επιφάνεια της χρωματογραφικής κορυφής που αντιστοιχεί στο εσωτερικό πρότυπο (Area Ratio). Η στατιστική επεξεργασία των καμπυλών αναφοράς έγινε χρησιμοποιώντας γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης (ελάχιστα τετράγωνα). Οι καμπύλες γραμμικότητας για κάθε υπόστρωμα φαίνονται στις Εικόνες 12, 13 & 14.

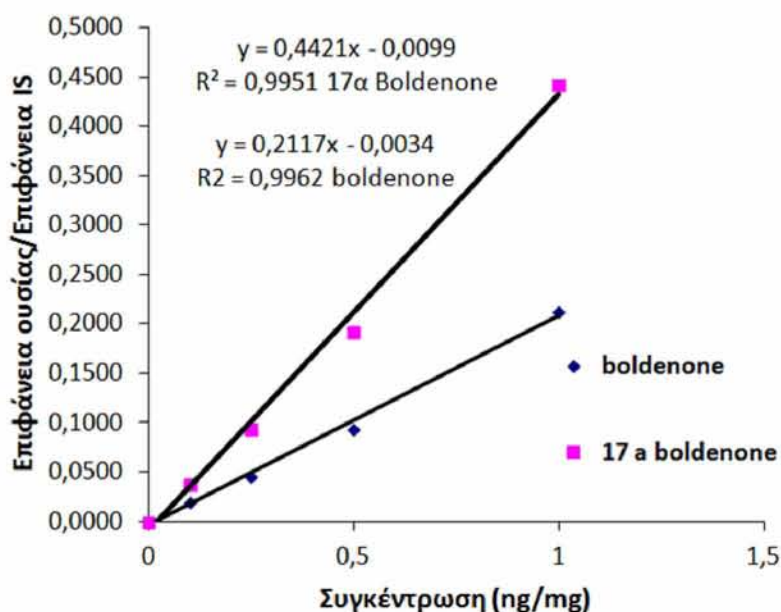
Πιο συγκεκριμένα, η γραμμικότητα της μεθόδου ανάλυσης των δειγμάτων ούρων κρίνεται ικανοποιητική, τόσο για τη μητρική ουσία ($r^2=0,9984$), αλλά και για τον μεταβολίτη της ($r^2=0,9995$), καθώς προκύπτει $r^2>0,99$ στο εύρος των συγκεντρώσεων που μελετήθηκαν (0 – 100 ng/ml). Επίσης, η γραμμικότητα της μεθόδου ανάλυσης των δειγμάτων αίματος και αυτή είναι ικανοποιητική για τη μητρική ουσία ($r^2=0,9988$) αλλά και για τον μεταβολίτη της ($r^2=0,9985$), καθώς προκύπτει $r^2>0,99$ στο εύρος των συγκεντρώσεων που μελετήθηκαν (0 – 100 ng/ml). Τέλος και η γραμμικότητα της μεθόδου ανάλυσης των δειγμάτων τρίχας κρίνεται ικανοποιητική για την μητρική ουσία ($r^2=0,9962$), αλλά και για τον μεταβολίτη της ($r^2=0,9951$), καθώς προκύπτει $r^2>0,99$ στο εύρος των συγκεντρώσεων που μελετήθηκαν (0 – 100 ng/ml).



Εικόνα 12: Καμπύλη γραμμικότητας μεθόδου για φορτισμένα δείγματα ούρων.



Εικόνα 13: Καμπύλη γραμμικότητας μεθόδου για φορτισμένα δείγματα αίματος.



Εικόνα 14: Καμπύλη γραμμικότητας μεθόδου για φορτισμένα δείγματα τρίχας.

1.3. Όριο Ανίχνευσης (LOD) και Όριο Ποσοτικοποίησης (LOQ)

Το όριο ανίχνευσης (LOD) της μεθόδου, υπολογίστηκε βάσει του λόγου σήματος προς θόρυβο ($S/N > 3$), ενώ το όριο ποσοτικοποίησης (LOQ) της μεθόδου βάσει του λόγου σήματος προς θόρυβο ($S/N > 10$). Οι τιμές LOD και LOQ για τη μητρική ουσία μπολντενόνη και για

τον μεταβολίτη της 17α-μπολντενόνη στα ούρα, το αίμα και την τρίχα παρουσιάζονται παρακάτω στον Πίνακα 8.

Πίνακας 8: LOD και LOQ των αναλυτικών μεθόδων ούρων, αίματος, τριχών.

Βιολογικό υπόστρωμα	Παράμετρος	Μπολντενόνη	17α-Μπολντενόνη
Ούρα	LOD (ng/ml)	3,2	2,0
	LOQ (ng/ml)	10,5	6,8
Αίμα	LOD (ng/ml)	3,0	1,5
	LOQ (ng/ml)	10,1	4,9
Τρίχα	LOD (ng/mg)	0,019	0,007
	LOQ (ng/mg)	0,065	0,024

1.4. Ανάκτηση

Για την εκτίμηση της ανάκτησης των μεθόδων για κάθε βιολογικό υπόστρωμα, τυφλά δείγματα φορτίστηκαν με τις προσδιοριζόμενες ουσίες και αναλύθηκαν με το ίδιο πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε για τα πραγματικά δείγματα. Η ανάκτηση προκύπτει εφαρμόζοντας την εξίσωση από την καμπύλη των προτύπων στην επιφάνεια των ουσιών στα φορτισμένα δείγματα. Η μέση ανάκτηση για κάθε μέθοδο στα βιολογικά υποστρώματα ούρα, αίμα και τρίχα φαίνεται στον Πίνακα 9.

Πίνακας 9: Μέση ανάκτηση, ακρίβεια και επαναληψιμότητα μεθόδων για τα βιολογικά υποστρώματα ούρα, αίμα και τρίχα.

	Ούρα (N=3)	Αίμα (N=2)	Τρίχα (N=3)
Ουσία	Μέση ανάκτηση (% ± SD)		
Μπολντενόνη	91,9 ± 6,9	28,5 ± 4,2	115,3 ± 4,6
17α – Μπολντενόνη	91,6 ± 6,4	38,0 ± 4,8	117,8 ± 9,3
	Ακρίβεια (% ± SD)		
Μπολντενόνη	98,9 (± 7,5)	93,3 (±15,9)	101,0 (±10,4)
17α – Μπολντενόνη	102,9 (± 10,8)	97,8 (±8,2)	95,5 (±8,1)
	Επαναληψιμότητα (%RSD ± SD)		
Μπολντενόνη	19,8 (±12,0)	32,0 (± 11,4)	21,4 (±10,5)
17α – Μπολντενόνη	17,9 (± 12,0)	18,9 (± 17,0)	16,7 (±21,4)

Η ανάκτηση για τα ούρα υπολογίστηκε σε τέσσερα διαφορετικά επίπεδα συγκεντρώσεων (10, 25, 50 και 100 ng/ml) για τρεις επαναλήψεις. Η ανάκτηση της μπολντενόνης

προσδιορίστηκε 91,9% ($\pm 6,9$), ενώ για τον μεταβολίτη της την 17α-μπολντενόνη 91,6% ($\pm 6,4$). Για το αίμα η διαδικασία εφαρμόστηκε σε τέσσερα επίπεδα συγκεντρώσεων (25, 50, 100 και 200 ng/ml) και έγιναν δύο επαναλήψεις. Η ανάκτηση της μπολντενόνης υπολογίστηκε 28,5% ($\pm 4,2$) και του μεταβολίτη της 38,0% ($\pm 4,8$). Για την τρίχα η διαδικασία εφαρμόστηκε σε τέσσερα επίπεδα συγκεντρώσεων (0,1, 0,25, 0,5 και 1 ng/mg) και έγιναν τρεις επαναλήψεις. Η μέση ανάκτηση των ουσιών μπολντενόνη και 17α-μπολντενόνη στην τρίχα προσδιορίστηκε 115,3% ($\pm 4,6$) και 117,8% ($\pm 9,3$), αντίστοιχα.

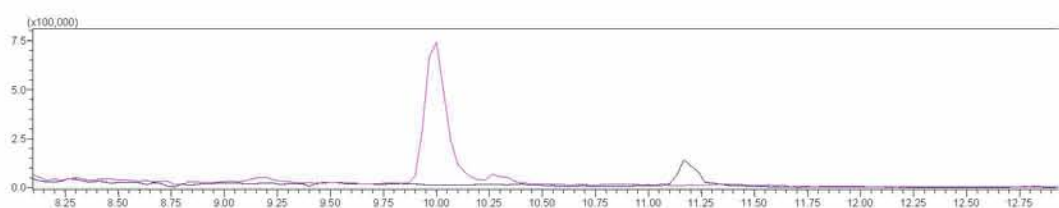
1.5. Ακρίβεια και Επαναληψιμότητα

Η ακρίβεια των μεθόδων προσδιορίστηκε από φορτισμένα δείγματα τριών επιπέδων για τα ούρα και τεσσάρων επιπέδων για το αίμα και την τρίχα. Στα ούρα τα επίπεδα αυτά ήταν 25, 50 και 100 ng/ml, στο αίμα 25, 50, 100 και 200 ng/ml, ενώ στην τρίχα ήταν 0,1, 0,25, 0,5 και 1 ng/mg. Έτσι λοιπόν, η ακρίβεια για τη μέθοδο των ούρων υπολογίστηκε για τη μπολντενόνη 98,9% \pm 7,5 (n=3) και για την 17α-μπολντενόνη 102,9% \pm 10,8 (n=3), για την μέθοδο του αίματος υπολογίστηκε για τη μπολντενόνη 93,3% \pm 15,9 (n=2) και για την 17α-μπολντενόνη 97,8% \pm 8,2 (n=2), ενώ τέλος για την μέθοδο της τρίχας υπολογίστηκε για τη μπολντενόνη 101,0% \pm 10,4 (n=3) και για την 17α-μπολντενόνη 95,5% \pm 8,1 (n=3).

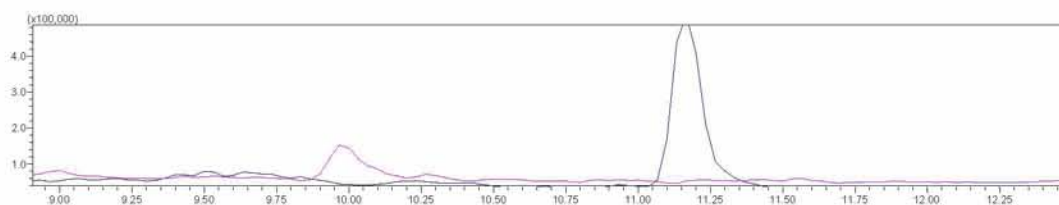
Η επαναληψιμότητα μιας μεθόδου εκφράζεται ως η επί τοις εκατό (%) σχετική τυπική απόκλιση (RSD) που ισούται με το πηλίκο της τυπικής απόκλισης δια τη μέση τιμή των πειραματικών αποτελεσμάτων. Η επαναληψιμότητα υπολογίστηκε για τις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό της ακρίβειας για διαφορετικές μέρες επεξεργασίας φορτισμένων δειγμάτων. Για τα ούρα και την τρίχα έγιναν τρεις επαναλήψεις, ενώ για το αίμα δύο. Για τη μέθοδο των ούρων η %RSD ήταν για την μπολντενόνη 19,8% ($\pm 12,0$) και για την 17α-μπολντενόνη 17,9% ($\pm 12,0$). Για τη μέθοδο του αίματος η %RSD ήταν για την μπολντενόνη 32,0% ($\pm 11,4$) και για την 17α-μπολντενόνη 18,9% ($\pm 17,0$) και τέλος για τη μέθοδο της τρίχας η %RSD ήταν για την μπολντενόνη 21,4% ($\pm 10,5$) και για την 17α-μπολντενόνη 16,7% ($\pm 21,4$). Η επαναληψιμότητα και η ακρίβεια για κάθε ουσία φαίνεται στον Πίνακα 9.

2. ΕΠΙΠΕΔΑ ΜΠΟΛΝΤΕΝΟΝΗΣ ΚΑΙ ΤΟΥ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΗ ΤΗΣ ΣΤΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ

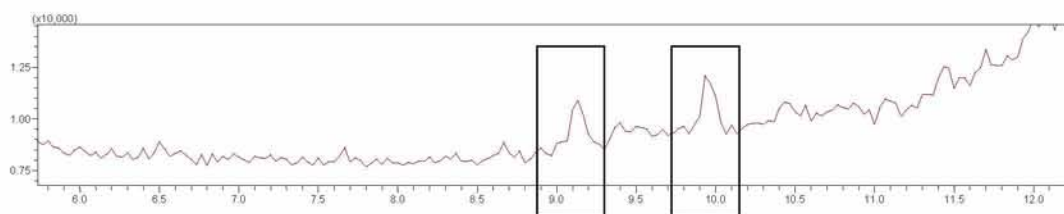
Σε κάθε σειρά ανάλυσης επεξεργάσθηκαν πρότυπα μεθανολικά διαλύματα μπολντενόνης, του μεταβολίτη της 17α-μπολντενόνης και φορτισμένα δειγμάτων ούρων, αίματος, τρίχας και ιστών. Χρωματογραφήματα πραγματικών δειγμάτων φαίνονται στην Εικόνα 15.



A. Δείγμα ούρων από το Group A τη δεύτερη ημέρα μετά τη χορήγηση. Η πρώτη κορυφή αντιστοιχεί στη μητρική ουσία, εκλύεται σε χρόνο 9,12 min με συγκέντρωση 101,9 ng/ml (LOD = 3,2 ng/ml) και η δεύτερη κορυφή αντιστοιχεί στον μεταβολίτη που εκλύεται σε χρόνο 9,95 min με συγκέντρωση 2142,7 ng/ml (LOD = 2,0 ng/ml).



B. Δείγμα ούρων από το Group B τη δέκατη ημέρα μετά τη χορήγηση. Η πρώτη κορυφή αντιστοιχεί στον μεταβολίτη, εκλύεται σε χρόνο 9,95 min με συγκέντρωση 50,8 ng/ml (LOD = 6,8 ng/ml).



Γ. Δείγμα αίματος από το Group A την πρώτη ημέρα μετά τη χορήγηση. Η πρώτη κορυφή αντιστοιχεί στη μητρική ουσία, εκλύεται σε χρόνο 9,12 min με συγκέντρωση 28,7 ng/ml (LOD = 3,0 ng/ml) και η δεύτερη κορυφή αντιστοιχεί στον μεταβολίτη που εκλύεται σε χρόνο 9,95 min με συγκέντρωση 17,6 ng/ml (LOD = 1,5 ng/ml).

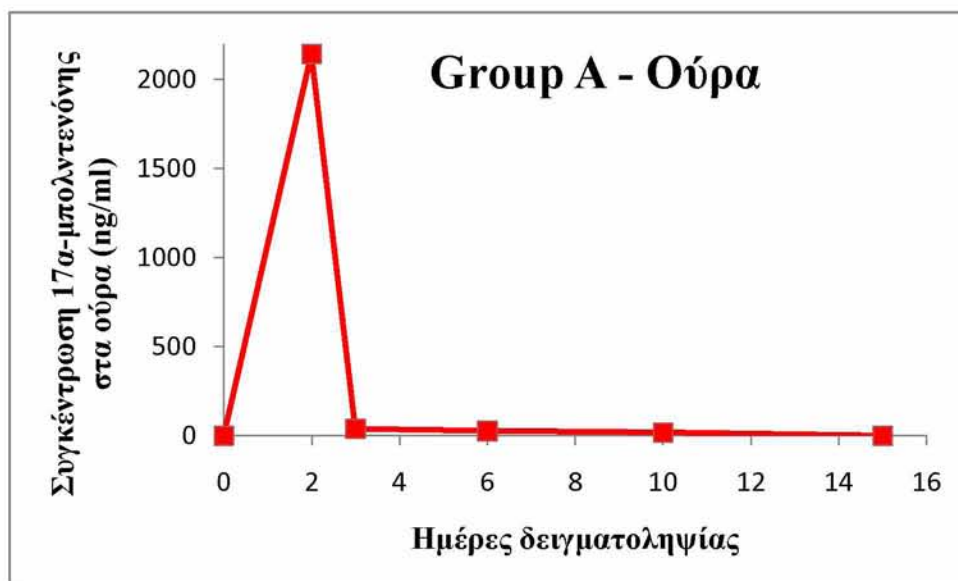
Εικόνα 15: Χρωματογραφήματα πραγματικών δειγμάτων.

2.1.Συγκεντρώσεις στα Ούρα

Η χαμηλότερη συγκέντρωση μητρικής ουσίας που προσδιορίστηκε στα δείγματα ούρων είναι 101,9 ng/ml η οποία είναι πολύ υψηλότερη από το όριο ανίχνευσης (3,2 ng/ml) και ποσοτικοποίησης της μεθόδου (10,5 ng/ml). Η χαμηλότερη συγκέντρωση μεταβολίτη που προσδιορίστηκε στα δείγματα είναι 7,9 ng/ml, η οποία είναι και αυτή πολύ υψηλότερη από το όριο ανίχνευσης (2,0 ng/ml) και ποσοτικοποίησης (6,8 ng/ml) της μεθόδου για τη συγκεκριμένη ουσία. Οι ημέρες δειγματοληψίας για το Group A είναι 0, 2^η, 3^η, 6^η, 10^η και 15^η ενώ για το Group B είναι 0, 7^η, 10^η, 15^η, 20^η, 25^η και 30^η. Οι ημέρες χορήγησης, ημέρες δειγματοληψίας και οι συγκεντρώσεις των ουσιών που προσδιορίστηκαν στα ούρα φαίνονται στον Πίνακα 10. Στο Group A η μητρική ουσία προσδιορίστηκε την 2η ημέρα μετά τη χορήγηση σε συγκέντρωση 101,9 ng/ml. Η μέγιστη συγκέντρωση του μεταβολίτη 2142,7 ng/ml προσδιορίστηκε την 2^η ημέρα μετά τη χορήγηση. Τις ημέρες 3, 6 και 10 παρουσιάστηκε πτωτική τάση στις συγκεντρώσεις του μεταβολίτη μέχρι την 15^η ημέρα όπου δεν προσδιορίστηκε καθόλου (Εικόνα 10). Από τα αποτελέσματα φαίνεται ότι η μέγιστη ποσότητα της ουσίας απεκκρίνεται μέσω των ούρων την δεύτερη ημέρα μετά την χορήγηση και αντιστοιχεί στο 92% της συνολικής ουσίας που απεκκρίθηκε είτε ως μητρική είτε ως μεταβολίτης.

Πίνακας 10: Συγκέντρωση της μολντενόνης και του μεταβολίτη της στα ούρα.

Πειραματόζωα	Ημέρα χορήγησης	Ημέρα δειγματοληψίας	Μέση συγκέντρωση μολντενόνη (ng/ml)	Μέση συγκέντρωση 17α-μολντενόνη (ng/ml)
Group A Εφάπαξ και υψηλή δόση	Ημέρα 0	0	<LOD	<LOD
		2 ^η	101,9	2142,7
		3 ^η	<LOD	38,7
		6 ^η	<LOD	27,2
		10 ^η	<LOD	18,2
		15 ^η	<LOD	<LOD
Group B Χαμηλές και επαναλαμβανόμενες δόσεις	Ημέρες 0, 6, 10, 16, 22, 28	7 ^η	<LOD	14,2
		10 ^η	<LOD	50,8
		15 ^η	<LOD	25,6
		20 ^η	<LOD	23,5
		25 ^η	<LOD	41,7
		30 ^η	<LOD	22,2

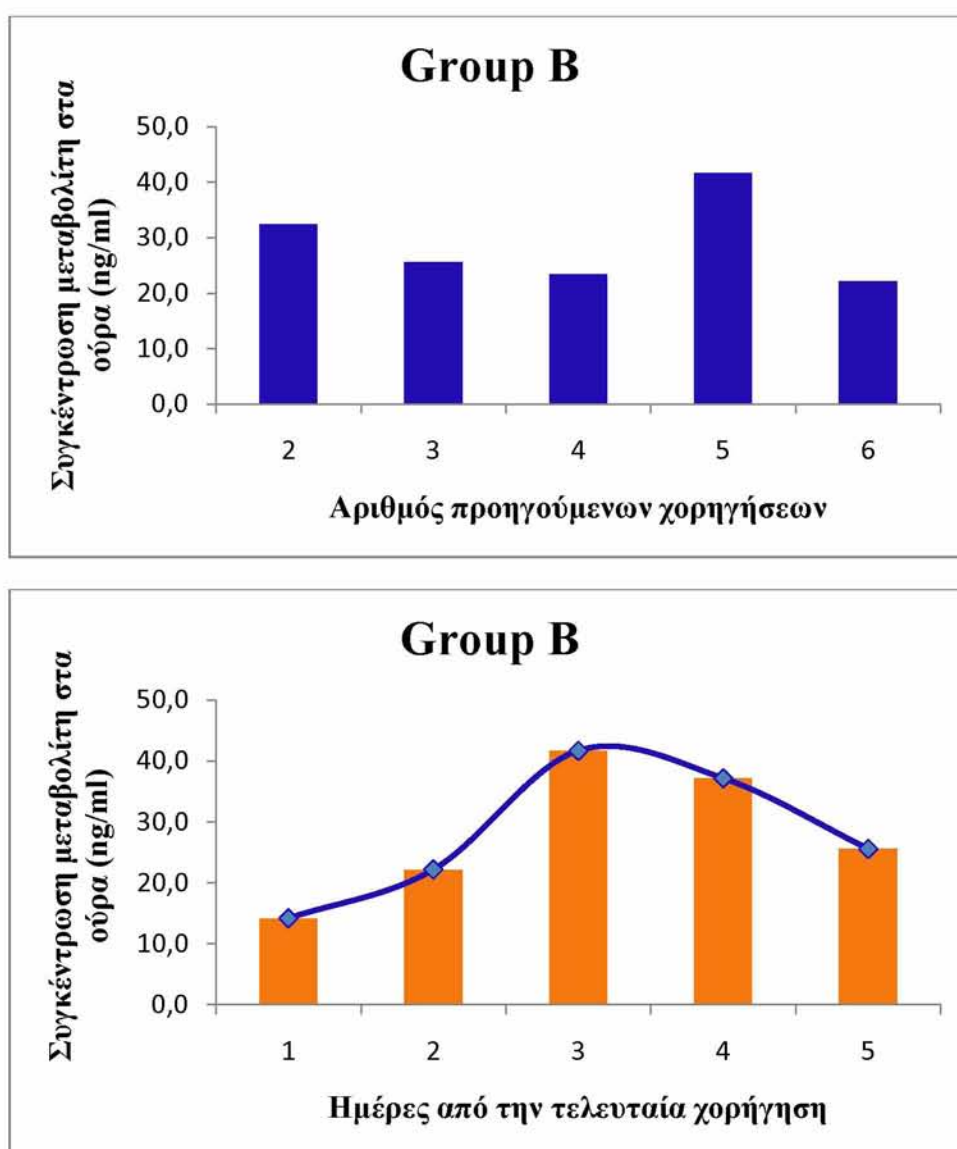


Εικόνα 16: Συγκέντρωση της 17α-μολντενόνης στα ούρα από το Group A την 2^η, 3^η, 6^η, 10^η και 15^η ημέρα μετά την χορήγηση 180 mg ουσίας.

Στο Group B προσδιορίστηκε μόνο ο μεταβολίτης της μολντενόνης σε συγκεντρώσεις από 14,2 ng/ml έως 50,8 ng/ml. Στον Πίνακα 11 φαίνονται οι συγκεντρώσεις που προσδιορίστηκαν στο Group B με βάση τις ημέρες χορήγησης που έχουν προηγηθεί της δειγματοληψίας και τις ημέρες από την τελευταία χορήγηση μέχρι τη δειγματοληψία. Τα δεδομένα αποτυπώνονται γραφικά στην Εικόνα 11, σύμφωνα με τα οποία παρατηρείται ότι η μέγιστη συγκέντρωση του μεταβολίτη για χαμηλή και παρατεταμένη έκθεση προσδιορίζεται όταν είχαν περάσει 3 και 4 ημέρες από την τελευταία χορήγηση. Ο χρόνος αυτός είναι μεταγενέστερος σε σχέση με το Group A το οποίο είναι αναμενόμενο καθώς πρόκειται για επαναλαμβανόμενες χορηγήσεις. Ο αριθμός των προηγούμενων χορηγήσεων δεν φαίνεται να επηρεάζει τις συγκεντρώσεις στα ούρα, το οποίο είναι αναμενόμενο διότι η ουσία δεν συσσωρεύεται στα ούρα αλλά απεκκρίνεται λίγες μέρες μετά από κάθε χορήγηση. Η μητρική ουσία δεν ανιχνεύτηκε καθόλου στην περίπτωση του Group B λόγω της χαμηλής δόσης χορήγησης. Συνεπώς, τα ούρα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την εκτίμηση της έκθεσης του οργανισμού στην μολντενόνη και ο μεταβολίτης της ουσίας αποτελεί βιοδείκτη της έκθεσης. Τα αποτελέσματα φαίνεται να συμφωνούν με άλλες έρευνες, καθώς η μητρική ουσία στα ούρα μεταβολίζεται και ο μεταβολίτης 17α-μολντενόνη είναι ανάλογος της δόσης που χορηγήθηκε. Το χρονικό διάστημα ανίχνευσης κυρίως του μεταβολίτη της μητρικής ουσίας κυμαίνεται σε 2 έως 4 ημέρες μετά την έκθεση (Fabresse et al., 2017).

Πίνακας 11: Συγκεντρώσεις του μεταβολίτη που προσδιορίστηκαν στο Group B ανάλογα με την τελευταία ημέρα χορήγησης και τις χορηγήσεις που έχουν προηγηθεί.

Ημέρα <i>in vivo</i> πειράματος	Ημέρες μετά την τελευταία χορήγηση	Χορηγήσεις που έχουν προηγηθεί (ημέρες χορήγησης)	Συγκέντρωση μεταβολίτη στο Group B (ng/ml)
7	1	2 (0, 6)	14,2
30	2	6 (0, 6, 10, 16, 22, 28)	22,2
25	3	5 (0, 6, 10, 16, 22)	41,7
10	4	2 (0, 6)	50,8
20	4	4 (0, 6, 10, 16)	23,5
15	5	3 (0, 6, 10)	25,6



Εικόνα 17: Σύγκριση των συγκεντρώσεων του μεταβολίτη της μολντενόνης στα ούρα για το Group B ανάλογα με τον αριθμό των χορηγήσεων μέχρι την ημέρα της δειγματοληψίας (επάνω) και με βάση τις ημέρες που έχουν περάσει από την τελευταία χορήγηση μέχρι την δειγματοληψία (κάτω).

2.2. Συγκεντρώσεις στο Αίμα

Η χαμηλότερη συγκέντρωση της μολντενόνης που προσδιορίστηκε στο αίμα είναι 28,2 ng/ml η οποία είναι πολύ υψηλότερη από το όριο ανίχνευσης (3,0 ng/ml) και το όριο ποσοτικοποίησης (10,1 ng/ml) της μεθόδου για τη συγκεκριμένη ουσία. Η χαμηλότερη συγκέντρωση του μεταβολίτη 17α-μολντενόνη στο αίμα είναι 13,7 ng/ml η οποία είναι επίσης υψηλότερη από το όριο ανίχνευσης (1,5 ng/ml) και όριο ποσοτικοποίησης (4,9 ng/ml). Οι ημέρες δειγματοληψίας για το Group A είναι 0, 1^η, 2^η, 3^η, 6^η και 10^η ενώ για το Group B 0, 7^η, 10^η, 15^η, 20^η, 25^η και 30^η. Στον Πίνακα 12 φαίνονται οι συγκεντρώσεις που προσδιορίστηκαν στο αίμα για τις δύο ομάδες, οι ημέρες χορήγησης της μολντενόνης και οι ημέρες δειγματοληψίας.

Πίνακας 12: Συγκέντρωση μολντενόνης και του μεταβολίτη της στο αίμα.

Πειραματόζωα	Ημέρα χορήγησης	Ημέρα δειγματοληψίας	Μέση συγκέντρωση μολντενόνης (ng/ml)	Μέση συγκέντρωση 17α-μολντενόνης (ng/ml)
Group A Εφάπαξ και υψηλή δόση	Ημέρα 0	0 ^η	<LOD	<LOD
		1 ^η	28,7	17,6
		2 ^η	28,2	20,6
		3 ^η	29,4	<LOD
		6 ^η	<LOD	<LOD
		10 ^η	<LOD	<LOD
Group B Χαμηλές και επαναλαμβανόμενες δόσεις	Ημέρες 0, 6, 10, 16, 22, 28	0 ^η	<LOD	<LOD
		7 ^η	<LOD	<LOD
		10 ^η	<LOD	<LOD
		15 ^η	<LOD	<LOD
		20 ^η	<LOD	13,7
		25 ^η	<LOD	<LOD
		30 ^η	<LOD	<LOD

Στο Group A προσδιορίστηκε η μητρική ουσία την 1^η, 2^η και 3^η ημέρα μετά την εφάπαξ χορήγηση σε συγκεντρώσεις 28,7, 28,2 και 29,4 ng/ml αντίστοιχα. Ο μεταβολίτης προσδιορίστηκε μόνο την 1^η και 2^η ημέρα σε συγκεντρώσεις 17,6 και 20,6 ng/ml αντίστοιχα. Την 6^η και 10^η ημέρα δεν ανιχνεύτηκε καμία ουσία. Στο Group B προσδιορίστηκε ο μεταβολίτης της ουσίας την 20^η ημέρα του *in vivo* πειράματος σε συγκέντρωση 13,7 ng/ml υποδεικνύοντας ότι η χορηγούμενη δόση ήταν αρκετά χαμηλή για να γίνει ανίχνευση. Τα

αποτελέσματα στο αίμα δείχνουν ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως υπόστρωμα για την εκτίμηση της έκθεσης στην μολυντενόνη και οι βιοδείκτες έκθεσης είναι τόσο η μητρική όσο και ο μεταβολίτης. Τα αποτελέσματα αυτά φαίνεται να συμφωνούν με άλλες έρευνες, καθώς στο αίμα εντοπίζονται ταυτόχρονα η μητρική ουσία και ο μεταβολίτης της μέχρι την απέκκρισή τους ή την αποθήκευση στον οργανισμό. Το χρονικό διάστημα ανίχνευσης μητρικής ουσίας και μεταβολίτη στο αίμα είναι από 6 έως και 200 ώρες (περίπου 8 ημέρες) μετά την έκθεση στην ουσία (Gray et al., 2011).

2.3. Συγκεντρώσεις στην Τρίχα

Στο Group A προσδιορίστηκε η μητρική ουσία μετά από 15 ημέρες εφάπαξ χορήγησης σε συγκέντρωση 0,69 ng/mg στο τμηματικό τρίχωμα και 0,026 ng/mg στο ολικό τρίχωμα. Η συγκέντρωση στο δείγμα ολικής τρίχας είναι χαμηλότερη σε σχέση με το τμηματικό όπως ήταν αναμενόμενο. Στο Group B δεν προσδιορίστηκε ούτε η μητρική, αλλά ούτε ο μεταβολίτης σε κανένα δείγμα τρίχας (Πίνακας 13).

Πίνακας 13: Συγκέντρωση μολυντενόνης και του μεταβολίτη της στην τρίχα.

Πειραματόζωα	Ημέρες δειγματοληψίας	Μέση συγκέντρωση μολυντενόνης (ng/ml)	Μέση συγκέντρωση 17α-μολυντενόνης (ng/ml)
Group A Εφάπαξ και υψηλή δόση	15 ^η – τμηματικό	0,069	<LOD
	15 ^η – ολικό	0,026	<LOD
	30 ^η – τμηματικό	<LOD	<LOD
	30 ^η – ολικό	<LOD	<LOD
	45 ^η – τμηματικό	<LOD	<LOD
	45 ^η – ολικό	<LOD	<LOD
Group B Χαμηλές και επαναλαμβανόμενες δόσεις	0	<LOD	<LOD
	15 ^η – ολικό	<LOD	<LOD
	15 ^η – τμηματικό	<LOD	<LOD
	30 ^η – ολικό	<LOD	<LOD
	30 ^η – τμηματικό	<LOD	<LOD
	45 ^η – ολικό	<LOD	<LOD
	45 ^η – τμηματικό	<LOD	<LOD

Ο μεταβολίτης της μολυντενόνης δεν ανιχνεύτηκε σε κανένα δείγμα γεγονός το οποίο ήταν αναμενόμενο καθώς είναι αρκετά πολική ουσία με αποτέλεσμα να απεκκρίνεται από τον οργανισμό χωρίς να αποθηκεύεται. Επίσης, στην τρίχα η μητρική ουσία συσσωρεύεται σε

πολύ μεγαλύτερη ποσότητα από τους αντίστοιχους μεταβολίτες, οι οποίοι πολλές φορές μπορεί να μην εντοπισθούν καθόλου (Strano-Rossi et al., 2013; Shen et al., 2009). Στο Group A, οι ανιχνευόμενες συγκεντρώσεις είναι πολύ μικρές σε σχέση με τη χορηγούμενη δόση, καθώς η απέκκριση στις τρίχες είναι μόνο μία από τις δευτερεύουσες οδούς αποτοξίνωσης του οργανισμού. Το γεγονός ότι δεν ανιχνεύτηκε καμία ουσία στην τρίχα από το Group B οφείλεται είτε στην χαμηλή δόση χορήγησης είτε στο μικρό χρονικό διάστημα χορήγησης της ουσίας. Όπως έγινε εμφανές από τα αποτελέσματα στα ούρα και το αίμα, ο χρόνος παραμονής της ουσίας στον οργανισμό είναι περίπου τρεις ημέρες με αποτέλεσμα να μην είναι αρκετός για να γίνει συσσώρευση της ουσίας στην τρίχα. Σε άλλη έρευνα που διεξήχθη με πειραματόζωα τα ινδικά χοιρίδια, χορηγήθηκε μια μόνο δόση (60 mg/kg) της ουσίας μπολντενόνη και η μέγιστη συγκέντρωση παρατηρήθηκε την 4^η ημέρα μετά τη χορήγηση και στη συνέχεια μειώθηκε γρήγορα από την 4^η έως την 12^η ημέρα. Μετά από αυτό, οι συγκεντρώσεις της μπολντενόνης μειώθηκαν σταδιακά και ήταν ακόμη ανιχνεύσιμες κατά την 20^η ημέρα μετά τη χορήγηση (Shen et al. 2009). Η συγκέντρωση της μπολντενόνης στις τρίχες των πειραματόζωων φαίνεται πως είναι δοσοεξαρτώμενη. Τέλος τα αποτελέσματα στην τρίχα υποδεικνύουν ότι ο βιοδείκτης έκθεσης στην μπολντενόνη είναι η ίδια η μητρική.

2.4. Συγκεντρώσεις στους Ιστούς

Μετά την θανάτωση του πειραματόζωου την 30^η ημέρα, πραγματοποιήθηκε λήψη των ιστών και κατάλληλη επεξεργασία αυτών με σκοπό τον έλεγχο της παρουσίας της μητρικής ουσίας αλλά και του μεταβολίτη της. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων (Πίνακας 14) έδειξαν την παρουσία του μεταβολίτη 17α-μπολντενόνη σε συγκέντρωση στο ήπαρ 8,1 ng/gr, στον αριστερό νεφρό 19,6 ng/gr και στον δεξιό νεφρό 8,0 ng/gr, ενώ στην καρδιά δεν ανιχνεύθηκε καθόλου (Πίνακας 14).

Το ήπαρ, ως το βιοχημικό εργοστάσιο του οργανισμού, εκτελεί πολλές και ζωτικές λειτουργίες. Είναι απαραίτητο για την ρύθμιση του μεταβολισμού, για την σύνθεση πολλών πρωτεϊνών και άλλων μορίων, καθώς και την απέκκριση πολλών φαρμάκων και τοξινών. Αυτές οι ουσίες μετατρέπονται συχνά σε ανενεργές μορφές μέσω αντιδράσεων, οι οποίες συντελούνται στα ηπατικά κύτταρα. Οι μετατροπές που γίνονται στο ήπαρ καθιστούν πιο υδατοδιαλυτές πολλές ουσίες, οι οποίες έτσι απεκκρίνονται ευκολότερα από τους νεφρούς.

Οι νεφροί επιτελούν ρυθμιστικές και εκκριντικές λειτουργίες, μέσω της επεξεργασίας του πλάσματος του αίματος από το οποίο κατακρατούν διάφορες ουσίες. Ανάμεσα στις πολλές

και σημαντικές λειτουργίες τους είναι και η απέκκριση ξένων χημικών ουσιών και των μεταβολικών προϊόντων τους από το αίμα μέσω των ούρων.

Η καρδιά παρουσιάζει μεγάλο εύρος δραστηριότητας και λειτουργικής ικανότητας εκτελώντας τεράστια ποσότητα έργου στη διάρκεια ζωής ενός οργανισμού. Η καρδιά αποτελείται από ένα ειδικό τύπο μυϊκού ιστού (μυοκάρδιο), ενώ εσωτερικά επενδύεται από επιθηλιακά κύτταρα (ενδοκάρδιο) και το κύριο έργο της είναι να λειτουργεί ως αντλία, ώστε μέσω της κυκλοφορίας του αίματος να διοχετεύσει στους ιστούς οξυγόνο και θρεπτικές ουσίες. Ωστόσο το αίμα μεταφέρει και άλλες ουσίες όπως για παράδειγμα ορμόνες και φάρμακα (Berne and Levy, 2002). Επιπλέον πρέπει να αναφερθεί ότι, τα κύτταρα της καρδιάς, όπως όλα τα κύτταρα ενός οργανισμού, έχουν ανάγκη παροχής οξυγόνου και θρεπτικών στοιχείων ώστε να λειτουργήσουν. Παρόλο που η καρδιά είναι συνεχώς γεμάτη με αίμα, το αίμα αυτό δεν μπορεί να παρέχει τα απαραίτητα συστατικά στα κύτταρα του μυοκαρδίου, γιατί δεν μπορεί να διαπεράσει το ενδοκάρδιο (Vander et al., 2001).

Από την λειτουργία των οργάνων όπως περιγράφηκε παραπάνω είναι πιθανό, επειδή στο ήπαρ και στους νεφρούς γίνεται επεξεργασία και διάσπαση των φαρμάκων, στον ηπατικό και νεφρικό ιστό να είναι ευκολότερα ανιχνεύσιμη μια ουσία ή οι μεταβολίτες της.

Πίνακας 14: Συγκέντρωση μολντενόνης και του μεταβολίτη της σε ιστούς.

Ιστοί	Ημέρα θανάτωσης 30^η	Μέση συγκέντρωση μολντενόνης (ng/gr)	Μέση συγκέντρωση 17α-μολντενόνης (ng/gr)
Ήπαρ	30 ^η	<LOD	8,1
Καρδιά	30 ^η	<LOD	<LOD
Αριστερός Νεφρός	30 ^η	<LOD	19,6
Δεξιός Νεφρός	30 ^η	<LOD	8,0

Δ. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Από την παρούσα μεταπτυχιακή εργασία και την μελέτη των αποτελεσμάτων της, θα μπορούσαν να εξαχθούν τα εξής συμπεράσματα:

- Η μέγιστη ποσότητα της ουσίας απεκκρίνεται μέσω των ούρων την δεύτερη ημέρα μετά την χορήγηση και αντιστοιχεί στο 92% της συνολικής ουσίας που απεκκρίθηκε είτε ως μητρική είτε ως μεταβολίτης.
- Η μέγιστη συγκέντρωση του μεταβολίτη για χαμηλή και παρατεταμένη έκθεση προσδιορίζεται όταν είχαν περάσει 3 και 4 ημέρες από την τελευταία χορήγηση.
- Ο αριθμός των προηγούμενων χορηγήσεων δεν φαίνεται να επηρεάζει τις συγκεντρώσεις στα ούρα, το οποίο είναι αναμενόμενο διότι η ουσία δεν συσσωρεύεται εκεί αλλά απεκκρίνεται λίγες μέρες μετά από κάθε χορήγηση.
- Τα ούρα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την εκτίμηση της έκθεσης του οργανισμού στην μολντενόνη και ο μεταβολίτης της ουσίας αποτελεί βιοδείκτη της έκθεσης.
- Το αίμα μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως υπόστρωμα για την εκτίμηση της έκθεσης στην μολντενόνη και οι βιοδείκτες έκθεσης είναι τόσο η μητρική όσο και ο μεταβολίτης.
- Στην τρίχα βιοδείκτης έκθεσης στην μολντενόνη είναι η ίδια η μητρική ουσία.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ελληνική Βιβλιογραφία

- Θεοδωρίδης Γ, (2015). *Βιοαναλυτική Χημεία*, Αθήνα: Σύνδεσμος Ελληνικών Ακαδημαϊκών Βιβλιοθηκών, Ελληνικά Ακαδημαϊκά Ηλεκτρονικά Συγγράμματα και Βοηθήματα [9].
- Παπαδογιάννης Ι, Σαμανίδου Β, (2001). *Ενόργανη Χημική Ανάλυση*, Θεσ/νίκη: Εκδόσεις Πήγασος.
- Σπάης Α, (2013). *Εκτροφή και Νοσολογία Κουνελιών*, Θεσ/νίκη: Εκδόσεις Σύγχρονη Παιδεία.
- Σφαιρόπουλος Α, (1982). *Τα εγχώρια κουνελοδέρματα ως γουναρικά. Μελέτη για την καταλληλότητά τους*. Θεσ/νίκη: Επιστ. Επετηρίδα Κτηνιατρικής Σχολής Α.Π.Θ., 24ος τόμος τεύχ. Α.
- Σφαιρόπουλος Α, (1993). *Κονικλοτροφία*, Θεσ/νίκη: Εκδοτικός Οίκος Α^{φών} Κυριακίδη Α.Ε..

Διεθνής Βιβλιογραφία

- Appenzeller B, Tsatsakis A, (2012). Hair analysis for biomonitoring of environmental and occupational exposure to organic pollutants: state of the art, critical review and future needs. *Toxicology Letters*. 210(2):119-4.
- Baron D, Martin D, Abol Magd S, (2007). Doping in sports and its spread to at-risk populations: an international review. *World Psychology*. 6(2): 118–123.
- Bassil N, Alkaade S, Morley J (2009). The benefits and risks of testosterone replacement therapy: a review. *Therapeutics and Clinical Risk Management*. 5 (3): 427–48.
- Berne R. and Levy M., (1996). *Αρχές Φυσιολογίας*, Μτφρ. Φ. Αγγελάτου, Γ. Βουκελάτου, Π. Γιομπρές, Α. Μητσάκου, Η. Κούβελας, Γ. Κωστόπουλος. Ηράκλειο: Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης (2002). Τόμος 1 & 2.
- Casarett & Doull (2010), *Βασική Τοξικολογία*, Μτφρ. Α. Γούλας, Ν. Ράικος, Σ. Τοπούζης, Δ. Χαρβάτης. Μεταμόρφωση Αττικής: Επιστημονικές Εκδόσεις Παρισιάνου Α.Ε. (2015).
- Cone E, (1996). Mechanisms of Drug Incorporation into hair. *Therapeutic Drug Monitoring*. 18(4):438-443.

- De Brabander H, Poelmans S, Schilt R, Stephany R, Le Bizec B, Draisci R, Sterk S, van Ginkel L, Courtheyn D, Van Hoof N, Macrì A, De Wasch K, (2004). Presence and metabolism of the anabolic steroid boldenone in various animal species: a review. *Food additives and contaminants*. 21(6):515-25.
- Esteban M, Castaño A, (2009). Non-invasive matrices in human biomonitoring: a review. *Environment International*. 35(2):438-49
- Evans N, (2004). Current concepts in anabolic-androgenic steroids. *The American journal of sports medicine*. 32(2):534-42.
- Fabresse N, Grassin-Delyle S, Etting I, Alvarez J, (2017). Detection and quantification of 12 anabolic steroids and analogs in human whole blood and 20 in hair using LC - HRMS/MS: application to real cases. *International Journal of Legal Medicine*. 131(4):989-999.
- Ferretti G, Palleschi L, Marchiafava C, delli Quadri F, Fantozzi L, Ferranti C, Cammarata P, Macrì A, Montesissa C, Draisci R, (2007). Excretion profile of boldenone and its metabolites after oral administration to veal calves. *Analytica chimica acta*. 589(2):269-74.
- Fineschi V, Baroldi G, Monciotti F et al (2001) Anabolic steroid abuse and cardiac sudden death: a pathologic study. *Arch Pathol Lab Med* 125:253–255.
- Fineschi V, Riezzo I, Centini F et al (2007) Sudden cardiac death during anabolic steroid abuse: morphologic and toxicologic.
- Gambelunghe C, Rossi R, Ferranti C, Rossi R, Bacci M, (2005). Hair analysis by GC/MS/MS to verify abuse of drugs. *Journal of applied toxicology:JAT*. 25(3):205-11.
- Gibson G, Skett P, (1986). *Introduction to Drug Metabolism*. Chapman and Hall. London-New York.
- Goldman A, Basaria S, (2018). Adverse health effects of androgen use. *Molecular and Cellular Endocrinology*, Volume 464, Pages 46-55.
- Gosetti F, Mazzucco E, Gennaro M, Marengo E, (2013). Ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry determination and profiling of prohibited steroids in human biological matrices. A review. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*. 15;927:22-36.

- Gray B, Teale P, Pearce C, (2011). Analysis of methyloxime derivatives of intact esters of testosterone and boldenone in equine plasma using ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Drug testing and analysis*. 3(4):206-13.
- Hourigan L, Rainbird AJ, Dooris M, (1998). Intracoronary stenting for acute myocardial infarction (AMI) in a 24-year-old man using anabolic androgenic steroids. *Australian and New Zealand Journal of Medicine*. 28(6):838-9.
- Kam P, Yarrow M, (2005). Anabolic steroid abuse: physiological and anaesthetic considerations. *Anaesthesia*. 60(7):685-92.
- Kintz P, Vayssette F, Deveau M, (2014) Compendium of results from hair tested for anabolics. *Toxicol Anal Clin* 26:197–200.
- Lazuras L, Barkoukis V, Loukovitis A, Brand R, Hudson A, Mallia L, Michaelides M, Muzi M, Petróczi A, Zelli A (2017), “I Want It All, and I Want It Now”: Lifetime Prevalence and Reasons for Using and Abstaining from Controlled Performance and Appearance Enhancing Substances (PAES) among Young Exercisers and Amateur Athletes in Five European Countries, *Frontiers in Psychology*, Τόμος 8, Άρθρο 717.
- Le Bizec B, Courant F, Gaudin I, Bichon E, Destrez B, Schilt R, Draisci R, Monteau F, André F, (2006). Criteria to distinguish between natural situations and illegal use of boldenone, boldenone esters and boldione in cattle 1. Metabolite profiles of boldenone, boldenone esters and boldione in cattle urine. *Steroids*. 71(13-14):1078-87.
- Maravelias C, Dona A, Stefanidou M, Spiliopoulou C, (2005). Adverse effects of anabolic steroids in athletes. A constant threat. *Toxicology Letters*, Volume 158, Issue 3, Pages 167-175.
- Mooradian A, Morley J, Korenman S, (1987). Biological actions of androgens. *Endocrine Reviews*. 8(1): 1–28.
- Muller R, (2010). History of Doping and Doping Control. *Doping in Sports, Hand-book of Experimental Pharmacology*. (195):1-23.
- Niessen W, (1999). State-of-the-art in liquid chromatography mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 856, 179-197.

- Núñez O, Gallart-Ayala H, Martins C, Lucci P, Busquets R, (2013). State-of-the-art in fast liquid chromatography - mass spectrometry for bio - analytical applications. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*. 15;927:3-21.
- Oda S, El-Ashmawy I, (2012). Adverse effects of the anabolic steroid, boldenone undecylenate, on reproductive functions of male rabbits. *International Journal of Experimental Pathology*. 93(3):172-8.
- Richardson V, (2000). *Rabbits Health, Husbandry & Diseases*. Oxford: Blackwell.
- Rivier L, (2000). Techniques for analytical testing of unconventional samples. *Bailliere's best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism*. 14(1):147-65.
- Rougeot J, Thebault R, (1985). *Le lapin Angora, sa toison, son élevage*. Les éditions de point vétérinaire. 25, rue Bourgelat, 94700 Maisons-Alfort.
- Samanidou V, Nazyropoulou C, (2013). The new generation of HPLC columns: Evolution of packing materials. Chapter for book *High-Performance Liquid Chromatography (HPLC): Principles, Practices and Procedures*. Nova Publishers.
- Sangiorgi E, Polignano V, Gardini S, (2005). Boldenone and related hormones quantification by liquid chromatography–mass spectrometry in urine and faeces after calf administration of boldenone undecanoate, *Anal. Chim. Acta* 529 239–248.
- Schanzert W, Donike M, (1992). Metabolism of Boldenone in Man: Gas Chromatographic/ Mass Spectrometric Identification of Urinary Excreted Metabolites and Determination of Excretion Rates *Biological Mass Spectrometry*, Vol.21, 3-16.
- Shen M, Xiang P, Yan H, Shen B, Wang M, (2009). Analysis of anabolic steroids in hair: time courses in guinea pigs. *Steroids*. 74(9):773-8.
- Strano-Rossi S, Castrignanò E, Anzillotti L, Odoardi S, De-Giorgio F, Bermejo A, Pascali V, (2013). Screening for exogenous androgen anabolic steroids in human hair by liquid chromatography/ orbitrap-high resolution mass spectrometry. *Analytica chimica acta*. 2;793:61-71.

- Suckow, Mark A, Brammer, David W, Rush, Howard G, Chrisp, Clarence E, (2002). Biology and Diseases of Rabbits, Chapter 9 in Laboratory Animal Medicine, 2nd Edition, James G. Fox, et. al., editors, New York: Academic Press.
- Swartz M, (2005). UPLC: An introduction and review. J. Liq. Chrom., 28(7&8), 1253-1263.
- Tousson E, El-Moghazy M, Massoud A, El-Atrash A, Sweef O, Akel A, (2016). Physiological and biochemical changes after boldenone injection in adult rabbits. Toxicology and Industrial Health. 32(1):177-82.
- Tuck S, Francis R, (2009). Testosterone, bone and osteoporosis. Frontiers of Hormone Research. Frontiers of Hormone Research. 37: 123–32.
- Vander A, Sherman J, Luciano D, Τσακόπουλος Μ, (2001). *Φυσιολογία του Ανθρώπου. Μηχανισμοί της Λειτουργίας του Οργανισμού*, Μτφρ. Ν. Γελαδάς, Θ. Κοκκορόγιαννης, Γ. Νάσσης, Μ. Κοσκολού, Χ. Καλαϊτζή, Κ. Κωστίκας, Δ. Φιλίππου, Κ. Φινέττη. Αθήνα: Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης. Τόμος 1 & 2.
- Wu X, Gao F, Zhang W, Ni J, (2015). Metabolism study of boldenone in human urine by gas chromatography-tandem mass spectrometry. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 115, 570–575.

Ηλεκτρονικές Διευθύνσεις

- [1]. <http://www.0069.syzefxis.gov.gr/> (Προσπελάσιμο 1/6/18)
- [2]. http://www.0069.syzefxis.gov.gr/images/stories/pdf/wada_OfficialTrans2015.pdf
(Προσπελάσιμο 1/6/18)
- [3]. <http://www.0069.syzefxis.gov.gr/images/stories/pdf/wadacode2009.pdf> (Προσπελάσιμο 1/6/18)
- [4]. http://www.0069.syzefxis.gov.gr/images/stories/pdf/prohibited_list_2018.pdf
(Προσπελάσιμο 1/6/18)
- [5]. <http://www.0069.syzefxis.gov.gr/images/stories/pdf/katalogos-apagoreymenon-2018-WADA-gr.pdf> (Προσπελάσιμο 1/6/18)
- [6]. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/13308#section=Top> (Προσπελάσιμο 8/6/18)
- [7]. <https://en.wikipedia.org/wiki/Boldenone> (Προσπελάσιμο 29/5/18)
- [8]. <https://en.wikipedia.org/wiki/Testosterone> (Προσπελάσιμο 29/5/18)
- [9]. www.kallipos.gr (Προσπελάσιμο 20/5/18)

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

Πίνακας Συντομεύσεων – Ακρωνυμίων

Α - Ζ	
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionization
CI	Chemical Ionization
EPO	Erythropoietin
ESI	Electro - Spray Ionization
FAB	Fast Atom Bombardment
GC	Gas Chromatography
GC-MS	Gas Chromatography – Mass Spectrometry
hGH	Human Growth Hormone
hCG	Human Chorionic Gonadotropin
HPLC	High Pressure/Performance Liquid Chromatography
IGF	Insulin Growth Factor 1
IOC	International Olympic Committee
IS	Internal Standard
LC	Liquid Chromatography
LC-MS	Liquid Chromatography – Mass Spectrometry
LD₅₀	Lethal Dose 50%
LOD	Limit of Detection
LOQ	Limit of Quantitation
MS	Mass Spectrometry

RSD	Relative Standard Deviation
SAFE YOU	Strengthening the Anti-Doping Fight in Fitness and Exercise in Youth
SFC	Supercritical fluid chromatography
TOF	Time of Flight
UPLS	Ultra-performance Liquid Chromatography
WADA	World Anti-Doping Agency
NaHCO₃	Όξινο Ανθρακικό Νάτριο
Na₂CO₃	Ανθρακικό Νάτριο
ΑΑΣ	Αναβολικά Ανδρογόνα Στεροειδή
ΕΣΚΑΝ	Εθνικό Συμβούλιο Καταπολέμησης του Ντόπινγκ
ΚΝΣ	Κεντρικό Νευρικό Σύστημα
ΜΒ	Μοριακό Βάρος
ΠΑΓΝΗ	Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Ηρακλείου
ΤΕΦΑΑ	Τμήμα Επιστήμης Φυσικής Αγωγής και Αθλητισμού

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ II

Κατάλογος Εικόνων

Εικόνα 1: Επιπτώσεις από την κατάχρηση ΑΑΣ	9
Εικόνα 2: Μεταβολισμός της μολντενόνης.....	10
Εικόνα 3: Δομική διαφορά των μορίων της τεστοστερόνης και της μολντενόνης.	12
Εικόνα 4: Τυπική διάταξη υγρού χρωματογράφου υψηλής πίεσης	14
Εικόνα 5: Σχηματικό διάγραμμα των τμημάτων ενός φασματογράφου μαζών με τις συντ/φίες των κυριότερων τεχνικών κάθε σταδίου	15
Εικόνα 6: Σχηματική διάταξη σύζευξης HPLC με ανιχνευτή MS.....	17
Εικόνα 7: Διάστημα ανίχνευσης ουσιών συγκριτικά στα διάφορα βιολογικά υλικά.....	19
Εικόνα 8: Σχηματογράφημα λεπτής υφής τρίχας και δέρματος κουνελιού.	21
Εικόνα 9: Σχηματογράφημα λεπτής υφής στηρικτικής τρίχας κουνελιού και εγκάρσια τομή προστατευτικής τρίχας κουνελιού.....	22
Εικόνα 10: Χρωματογραφήματα των ουσιών μολντενόνη (m/z 328.25, 269.15, χρόνος έκλουσης 9,12 min), 17α- μολντενόνη (m/z 328.25, 269.15, χρόνος έκλουσης 9,95 min) και turinabol (εσωτερικό πρότυπο, IS, m/z 317.25, 355.25, χρόνος έκλουσης 11,16 min).....	36
Εικόνα 11: Καμπύλη γραμμικότητας του οργάνου όπως προκύπτει από πρότυπα διαλύματα.	38
Εικόνα 12: Καμπύλη γραμμικότητας μεθόδου για φορτισμένα δείγματα ούρων.....	39
Εικόνα 13: Καμπύλη γραμμικότητας μεθόδου για φορτισμένα δείγματα αίματος.....	40
Εικόνα 14: Καμπύλη γραμμικότητας μεθόδου για φορτισμένα δείγματα τρίχας.	40
Εικόνα 15: Χρωματογραφήματα πραγματικών δειγμάτων.....	43
Εικόνα 16: Συγκέντρωση της 17α-μολντενόνης στα ούρα από το Group A την 2 ^η , 3 ^η , 6 ^η , 10 ^η και 15 ^η ημέρα μετά την χορήγηση 180 mg ουσίας.....	45
Εικόνα 17: Σύγκριση των συγκεντρώσεων του μεταβολίτη της μολντενόνης στα ούρα για το Group B ανάλογα με τον αριθμό των χορηγήσεων μέχρι την ημέρα της δειγματοληψίας (επάνω) και με βάση τις ημέρες που έχουν περάσει από την τελευταία χορήγηση μέχρι την δειγματοληψία (κάτω).....	46

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1: Πρωτόκολλο χορήγησης δόσεων μολντενόνης στα πειραματόζωα.....	27
Πίνακας 2: Χρονοδιάγραμμα δειγματοληψίας βιολογικών υλικών της Ομάδας Α.....	28
Πίνακας 3: Χρονοδιάγραμμα δειγματοληψίας βιολογικών υλικών της Ομάδας Β.....	28
Πίνακας 4: Βάρος των δειγμάτων των τριχών του Group Α.....	32
Πίνακας 5: Βάρος τριχών των δειγμάτων του Group Β1 (πρώτο ζώο της δεύτερης ομάδας).....	32
Πίνακας 6: Βάρος τριχών των δειγμάτων του Group Β2 (δεύτερο ζώο της δεύτερης ομάδας).....	33
Πίνακας 7: Χρόνος έκλουσης και επιλεγμένα ιόντα για κάθε ουσία.....	35
Πίνακας 8: LOD και LOQ των αναλυτικών μεθόδων ούρων, αίματος, τριχών.....	41
Πίνακας 9: Μέση ανάκτηση, ακρίβεια και επαναληψιμότητα μεθόδων για τα βιολογικά υποστρώματα ούρα, αίμα και τρίχα.....	41
Πίνακας 10: Συγκέντρωση της μολντενόνης και του μεταβολίτη της στα ούρα.....	44
Πίνακας 11: Συγκεντρώσεις του μεταβολίτη που προσδιορίστηκαν στο Group Β ανάλογα με την τελευταία ημέρα χορήγησης και τις χορηγήσεις που έχουν προηγηθεί.....	46
Πίνακας 12: Συγκέντρωση μολντενόνης και του μεταβολίτη της στο αίμα.....	47
Πίνακας 13: Συγκέντρωση μολντενόνης και του μεταβολίτη της στην τρίχα.....	48
Πίνακας 14: Συγκέντρωση μολντενόνης και του μεταβολίτη της σε ιστούς.....	50